

Untersuchungen zur Rolle von p62 in der Signaltransduktion von CD40



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kristina Manuela Maria Seibold
aus
Stuttgart

im Jahr
2015

Untersuchungen zur Rolle von p62 in der Signaltransduktion von CD40



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Biomedizinischen Wissenschaften
(Dr. rer. physiol.)

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Kristina Manuela Maria Seibold
aus
Stuttgart

im Jahr
2015

Dekan:

Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

Betreuer:

Prof. Dr. Dr. André Gessner

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und ohne unzulässige Hilfe Dritter, Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe; die aus anderen Quellen übernommenen Konzepte sind unter Angabe des Literaturzitats gekennzeichnet. Diese Arbeit hat weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen.

Ich erkläre weiterhin, dass ich, außer mit den Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben habe, noch versucht habe zu erwerben.

Regensburg, den 15.12.15



Kristina Seibold

Inhaltsverzeichnis:

Untersuchungen zur Rolle von p62 in der Signaltransduktion von CD40.....	I
Eidesstattliche Erklärung.....	V
1. Einleitung:	1
1.1 Makrophagen	1
1.2 Das Adapterprotein p62/Sequestosome1	2
1.3 Die TNF und TNF Rezeptor Superfamilie	4
1.3.1 Das TNF/TNFR1 System.....	6
1.3.2 Das CD40L/CD40 System.....	8
1.3.3 NF- κ B Aktivierung.....	10
1.3.4 Die MAPK p38, JNK und ERK.....	13
1.3.5 Der PI3K/Akt Signalweg	14
1.4 Das Adapterprotein TRAF6 in der inflammatorischen Signaltransduktion.....	15
1.5 Zielsetzung der Arbeit	18
2. Materialien:	19
2.1 Geräte.....	19
2.2 Verbrauchsmaterialien	19
2.3 Chemikalien, Medien und Reagenzien	20
2.4 Puffer und Lösungen.....	21
2.5 Antikörper.....	22
2.6 Kits:	23
2.7 Mauslinien, Bakterien und Zelllinien	23
2.8 Software.....	24
3. Methoden:	25
3.1 Zellkultur	25
3.2 Kultivierung von Bakterien	25
3.3 Erstellung von Knochenmarksmakrophagen (BMDM).....	26
3.4 Bestimmung der bakteriellen Replikation von <i>Listeria monocytogenes</i> in BMDM.....	26
3.5 Erstellung und Differenzierung konditionierte ER-Hoxb8 Stammzelllinie.....	27
3.6 Mikroskopie.....	28
3.7 Durchflusszytometrie.....	28
3.8 Erstellung von Zelllysaten	29
3.9 Proteinbestimmungen	29
3.10 SDS-PAGE und Immunblot.....	30
3.11 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)	30
3.12 Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden	31

3.13 CD40L Produktion.....	31
3.14 Immunpräzipitation.....	32
3.15 Statistik	33
4. Ergebnisse:	34
4.1 p62-Defizienz beeinflusst nicht die Erregerlast von <i>Listeria monocytogenes</i> , die Sekretion von IL-1 β wird aber erhöht.....	34
4.2 TNFR1- abhängige inflammatorische Signalwege in BMDMs werden nicht durch p62-Defizienz beeinflusst	36
4.3 ER-Hoxb8 Makrophagen (M-MØP) sind morphologisch und funktionell ein valides Makrophagensystem.....	39
4.4 Verringerungen der NF- κ B Aktivierung in p62 $_{\Delta$ ST-M-MØPs nach CD40L-Stimulation	44
4.5 Bildung eines TRAF6-p62-abhängigen Komplex nach CD40 Stimulation.....	47
4.6 TRAF6 und p62 sind Komponenten des CD40 Rezeptorkomplex in 786-O	48
4.7 Der Knockdown von p62 in 786-O hatte keinen signifikanten Effekt auf die Aktivierung inflammatorische Signalwege.....	51
5. Diskussion:	54
5.1. Das <i>bona fide</i> ER-Hoxb8 Makrophagensystem.....	54
5.2 Die duale Rolle von p62 auf inflammatorische Signalwege und der Einfluss auf das Infektionsgeschehen	55
5.3 p62 als Modulator von CD40- assoziierten Signalwegen.....	60
6. Zusammenfassung:	64
7. Summary:	66
Anhang:	III
Abkürzungsverzeichnis:	III
Abbildungsverzeichnis:	VI
Literaturverzeichnis:.....	VII
Danksagung	XV

1. Einleitung:

1.1 Makrophagen

Makrophagen modulieren als Teil des angeborenen Immunsystems zahlreiche Zellfunktionen wie Entzündungsgeschehen, Entfernung von Zelldetritus und die Gewebshomöostase. Dabei spielen Makrophagen als antigenpräsentierende Zellen auch in der adaptiven Immunantwort bei der Bekämpfung von Erregern eine wichtige Rolle. Im Knochenmark gebildet, entwickeln sich Makrophagen aus Monozyten, die über den Blutstrom in verschiedenen Gewebe einwandern. Je nach Lokalisierung in den verschiedenen Geweben unterscheiden sich Makrophagen in ihrer Morphologie und werden daher in Subpopulationen unterteilt. So werden beispielsweise Makrophagen im Gehirn als Mikrogliazellen, in der Lunge als Alveolarmakrophagen und der Leber als Kupffer'sche Sternzellen bezeichnet (1). Makrophagen sind Teil des mononukleär-phagozytären Systems und haben vielfältige Aufgaben im Rahmen der Erregerabwehr. So erkennen Makrophagen über „*Toll-like*“ Rezeptoren (TLR) Pathogen-assoziierte Molekülstrukturen (PAMPs) aus Mikroorganismen und Gefahr-assoziierte Molekülstrukturen (DAMPs) aus beschädigtem Gewebe. Die durch PAMPs und DAMPS induzierte Signalantwort ist nur ein Beispiel der möglichen verschiedenen Stimuli, welche die Aktivierung der Makrophagen auslöst. Dabei charakterisiert die Bezeichnung klassisch-aktivierte Makrophagen, Effektormakrophagen, die während der Immunantwort durch die Stimulation mit Interferon γ (IFN γ) und Tumor-Nekrose Faktor (TNF) entstehen (2). Diese Makrophagenpopulation zeichnet sich durch die Sekretion von großen Mengen an inflammatorischen Zytokinen, antimikrobiellen Proteinen und reaktiven Sauerstoffspezies aus, die eine damit verbundene besonders hohe mikrobizide Kapazität aufweisen (3). Dabei sind Rezeptoren und Liganden der TNF Superfamilie wie das TNFR1/TNF und das CD40/CD40 System eng mit der Immunantwort von Makrophagen verknüpft. Diese sind für die spezifische Entzündungsreaktion und die damit verbundene Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie TNF und IL-1 β verantwortlich (4).

Neben der Aufnahme und dem Abbau von extrazellulärem Zelldebris oder Pathogenen über Phagozytose, ist in der Makrophagen-abhängigen Erregerabwehr auch die Autophagozytose von Bedeutung. Die Autophagozytose bezeichnet den Prozess in dem zelleigene Bestandteile degradiert werden. Autophagosomen sind gekennzeichnet durch die Ausbildung einer Doppelmembran, die zytoplasmatische Proteine, Organellen oder intrazelluläre Bakterien umschließt. Diese Vesikel fusionieren mit dem Lysosom, in dem das Substrat freigesetzt und

über Hydrolasen abgebaut wird (5). In diesen Prozess ist das multifunktionelle Adapterprotein p62 involviert, welches auch in der Pathogenabwehr eine große Rolle spielt. Da in dieser Arbeit Funktionen von p62 in einem Listerieninfektionsmodell und in der Modulation der TNFR1- und CD40- abhängigen Signaltransduktion untersucht wurden, werden diese Systeme in den nachfolgenden Kapiteln vorgestellt.

1.2 Das Adapterprotein p62/Sequestosome1

Das Adapterprotein p62 agiert in diversen Signaltransduktionswegen. Entdeckt wurde das 62 kDa Protein als ein Interaktionspartner von p56^{lck} (6). Im Jahr 1996 wurde dann das durch oxidativen Stress induzierte Protein A170 in murinen peritoneal-Makrophagen gefunden, das 90 % strukturelle Homologie zu dem p56^{lck}-assoziierten Protein aufweist (7). Zur gleichen Zeit wurde p62, genannt ZIP, als ein Interaktionspartner von atypischen Protein Kinasen (aPKC) in Ratten identifiziert. Diese Kinasen phosphorylieren Hydroxylgruppen an Serin- und Threonin- Resten und wirken im Gegensatz zu den typischen Protein Kinasen unabhängig von Ca²⁺ und Lipid „*second messengers*“ (8). Strukturell binden aPKCs an die PB1- (Phox und Bem1p-1) Domäne von p62, welche am N-Terminus lokalisiert ist. Die PB1-Domäne, kritisch für viele Funktionen von p62, vermittelt Protein-Protein Interaktionen durch Dimerisierung und Oligomerisierung (9). Die Analyse von weiteren Interaktionspartnern von p62 über die PB1-Domäne mit Proteinen wie MEK5 oder MEKK3 ergab, dass p62 dadurch auch NF-κB Signalwege modulieren kann (10). Im Molekül p62 folgt der PB1-Domäne eine ZZ Region, die fähig ist an RIP1 zu binden, ein Intermediat des TNF-Rezeptor Signalkomplexes (11). Ein weiteres Protein, das ursprünglich als intrazelluläres Adapterprotein in der Signaltransduktion einiger Rezeptoren der TNF Superfamilie entdeckt wurde, TRAF6, kann über die TRAF-Domäne an die TBS („*TRAF binding site*“) Sequenz von p62 binden, die hinter der ZZ Region liegt (12). Zudem verfügt p62 über zwei Kernlokalisationssequenzen und eine Kernexportsequenz und klassifiziert sich damit als kontinuierliches Transportmolekül zwischen Kern und Cytoplasma (13). Bei p62 handelt es sich um ein Protein mit einer geringen intrazellulären Halbwertszeit von etwa 6 h, kennzeichnend dafür sind Prolin, Serin und Threonin reiche Regionen, die als PEST-Sequenzen bezeichnet werden und den Abbau initiieren (14). Der Abbau von p62 erfolgt über zwei verschiedene Degradationsmechanismen, die über Ubiquitinierung gesteuert werden. Durch die am C-Terminus lokalisierte Ubiquitin-assoziierte (UBA) Domäne kann p62 direkt an ubiquitinierte Proteine binden und dient je nach Vernetzungsgrad der Ubiquitinketten als „*Shuttle*“ für den proteosomalen Abbau (K48-verlinkte Ubiquitinketten) oder als Interaktionsplattform für Signaltransduktionen (K63-verlinkte Ubiquitinketten)

Ubiquitinketten) (15, 16). Neben dem proteasomalen Abbau spielt p62 eine wichtige Rolle in der autophagosomalen-lysosomalen Degradation. Ein wichtiger Bestandteil für die Reifung des Autophagosoms ist das Protein LC3, welches aus dem Endoplasmatischen Retikulum hervorgeht. Über die LC3-interagierende Region (LIR), die in p62 vor der UBA-Domäne lokalisiert ist, kann p62 ubiquitinylierte Proteine auch für den autophagosomalen Abbau bereitstellen (17). Abbildung 1 gibt eine schematische Übersicht über die Domänenarchitektur von p62 und erläutert kurz deren Funktion sowie die Lokalisation im Protein.

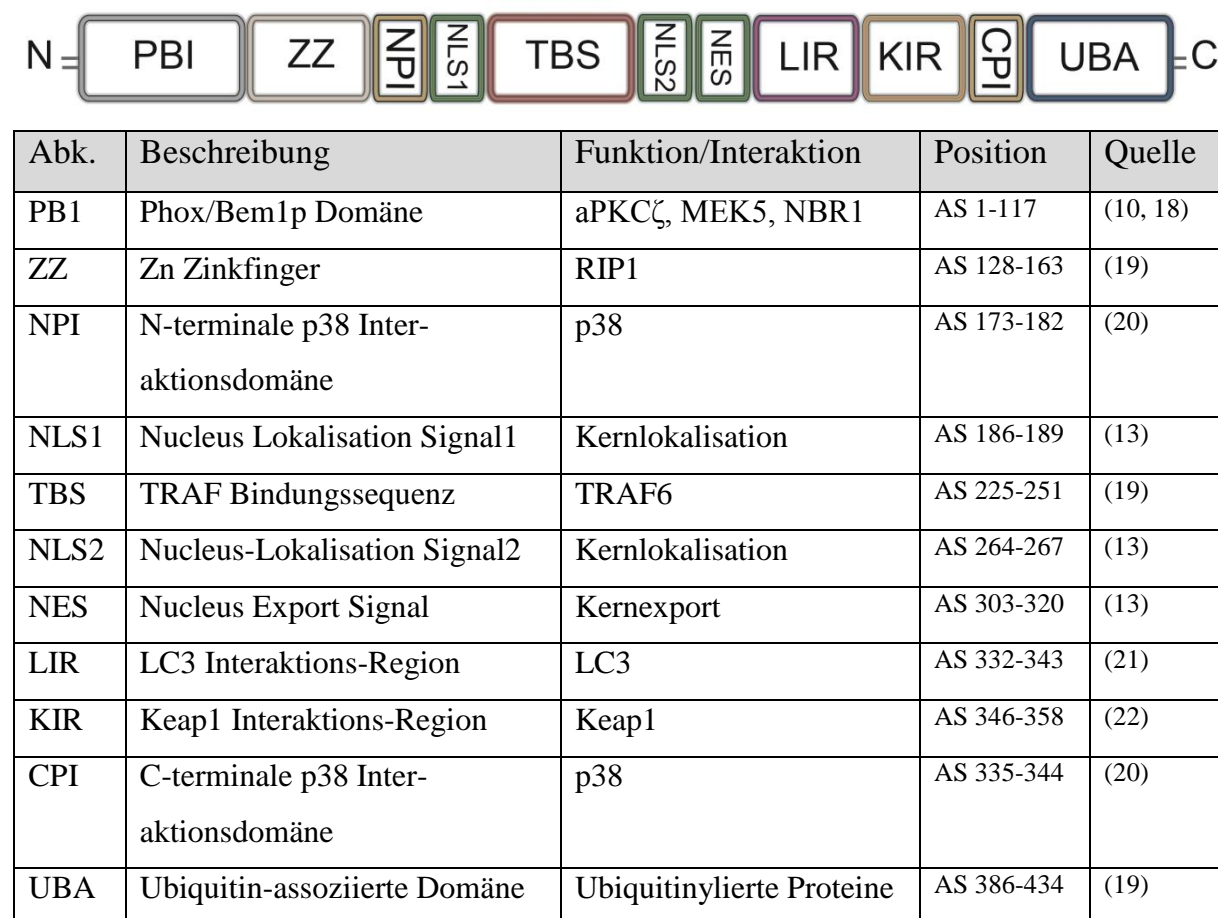


Abbildung 1: Aufbau und Funktionen des Proteins p62

Schematischer Aufbau von p62 mit den einzelnen Domänen mit ihrer Funktion und/oder Interaktionspartnern.

Die vielseitigen Rollen und Funktionen von p62 bringen das Protein auch mit wichtigen Immunologischen Aspekten, wie Erregerabwehr aber auch mit einigen Krankheiten in Verbindung. Die Fähigkeit als Cargo-Rezeptor für den autophagosomalen Abbau von ubiquitinylierten Proteinen wurde in verschiedenen Infektionsmodellen untersucht. In diesem Fall stellt p62 bei einer intrazellulären Infektion von Salmonellen, Shigellen oder Mykobakterien einen Teil der angeborenen Immunantwort dar (23). Die Rekrutierung von p62 zu ubiquitinylierten Proteinen, die am Bakterium lokalisiert sind, führt zu deren Abbau über den autophagosomalen

Signalweg (24). Zudem ist die Expression von p62 während einer Infektion essentiell für eine effiziente Autophagie und für die Reduzierung von intrazellulären Erregern wie Salmonellen (25). Neben der Rolle von p62 als bakterielles-„Shuttle“ für den autophagosomalen Abbau konnte, während einer Infektion mit *Mycobacterium tuberculosis*, die p62- abhängige Rekrutierung cytosolischer Proteine in das Autophagosom beobachtet werden. Diese werden im Autophagosom zu antimikrobiellen Peptiden gespalten (26).

Auf der anderen Seite ist es aber die Autophagozytose, die p62 mit der Entstehung von Tumoren in Zusammenhang bringt. So korreliert eine Akkumulation von p62 mit der Entstehung von Brustkrebs (27), Lungen-Adenokarzinomen (28), Leberkarzinomen und Tumoren im gastrointestinalen Trakt und ist zudem mit einer schlechten Patienten-Prognose assoziiert (29). Eine weitere Krankheit die in Zusammenhang mit p62 steht, ist Morbus-Paget, eine Knochenkrankheit, für die ein unorganisierter und deformierter Knochenumbau charakteristisch ist. 10 % der Mutationen die in Paget-Patienten identifiziert wurden resultieren in dem Funktionsverlust der C-terminalen UBA Domäne von p62 (30). Durch die Erstellung einer *knockout* Maus mit der äquivalenten Punktmutation in p62 konnte demonstriert werden, dass diese Mäuse eine Paget-Krankheit entwickelten (31). Mittels p62 *knockout* Maus wurde bereits früher versucht, die Funktionen von p62 zu untersuchen. Diese p62^{-/-}-Mäuse zeigten während ihrer Entwicklung eine erhöhte Fettleibigkeit mit verminderter basaler Stoffwechselrate. Dies führte bei der erwachsenen Maus zu einer Leptin-Resistenz und beeinträchtigte die Glukose- und Insulin- Toleranz (32).

1.3 Die TNF und TNF Rezeptor Superfamilie

Die Tumornekrosefaktor (TNF) und TNF Rezeptor Familie umschließt eine Klasse von Zytokinen und ihren Rezeptoren, die eine große Rolle in der Regulation von Immunantworten und im Entzündungsgeschehen spielen. Den Namen verdankt diese Familie dem Zytokin TNF, das als Sekretionsprodukt von Makrophagen einen letalen Effekt auf bestimmten Tumorzellen aufwies und bereits 1975 von Carswell beschrieben wurde (33). Die Liganden der TNF-Superfamilie sind Typ II Transmembranproteine und kommen in membranständiger oder löslicher Form vor. Durch Selbstassemblierung bilden diese nicht kovalent gebundene, bioaktive Homo-/Hetero-Trimere. Die Ligand-Familie weist Sequenzhomologien von 20-30 % in einer aus 150 Aminosäuren bestehenden Sequenz, der „*TNF homology domain*“ (THD) auf. Diese am C-terminus lokalisierten Domänen sind für die Bindung an Cystein-reiche Domänen (CRD) und für die Trimerisierung der Rezeptoren mitverantwortlich (34). Rezeptoren der

TNF Superfamilie gehören mit wenigen Ausnahmen zur Klasse der Typ I Transmembranproteine. Die Transmembrandomäne durchquert dabei die Membran genau einmal und der N-Terminus befindet sich im extrazellulären Teil (35). Zu den Ausnahmen gehören die Rezeptoren DcR3 und OPG, diese haben keine Membranverankerung und werden als lösliche Rezeptoren sezerniert (36, 37). Auch von den membranständigen Rezeptoren existieren lösliche Formen. Diese entstehen durch Proteolyse im extrazellulären Teil oder durch alternatives Spleißen. Diese löslichen Rezeptoren wirken dabei als Antagonist für den Ligand, als Ligand-„Carrier“ Proteine und als Reservoir für den Ligand (38). Ein gemeinsames strukturelles Merkmal der Rezeptoren der TNFR Superfamilie sind die sogenannten „cysteine-rich domains“ (CRD). Diese sind sich wiederholende Regionen von etwa 40 Aminosäuren, in denen typischerweise sechs Cysteinreste für die Ausbildung von Disulfidbrücken verantwortlich sind. Die CRD stabilisieren dabei die längliche Domänenform und sind wichtig für Ligandbindung und Rezeptortrimerisierung (39). Die Rezeptortrimerisierung wird jedoch nicht, wie ursprünglich vermutet durch den Ligand ausgelöst. Vor der Ligation wird über die „pre-ligand binding assembly domain“ (PLAD) in den meisten Fällen eine Homotrimerisierung der entsprechenden Rezeptoren an der Membran organisiert. Die cytoplasmatische Region der Rezeptoren dient als Bindungsstelle für Adapterproteine bei der Signaltransduktion. Dabei unterscheidet man im Allgemeinen zwei Klassen von Adapterproteinen: Adapterproteine ohne Todesdomäne („death domain“, DD) wie TNF-Rezeptor-assoziierte Proteine (TRAFs) und Moleküle mit Todesdomäne. Der Gruppe der TNF Rezeptoren, die eine etwa 80 Aminosäuren lange Todesdomäne (DD) im cytoplasmatischen Teil vorweisen, werden auch Todesrezeptoren genannt. Neben inflammatorischen Signalwegen können die Todesrezeptoren, durch die Aktivierung von Caspase-8 oder Caspase-10, den Zelltod induzieren. Zu den klassischen Todesrezeptoren gehören TNFR1, CD95, DR3, DR4, DR5, DR6, EDAR und NGFR (40, 41). Die TNF-/ TNFR-Familie umfasst derzeit 19 Liganden, die über 29 Rezeptoren agieren (39, 42) (Abb. 2).

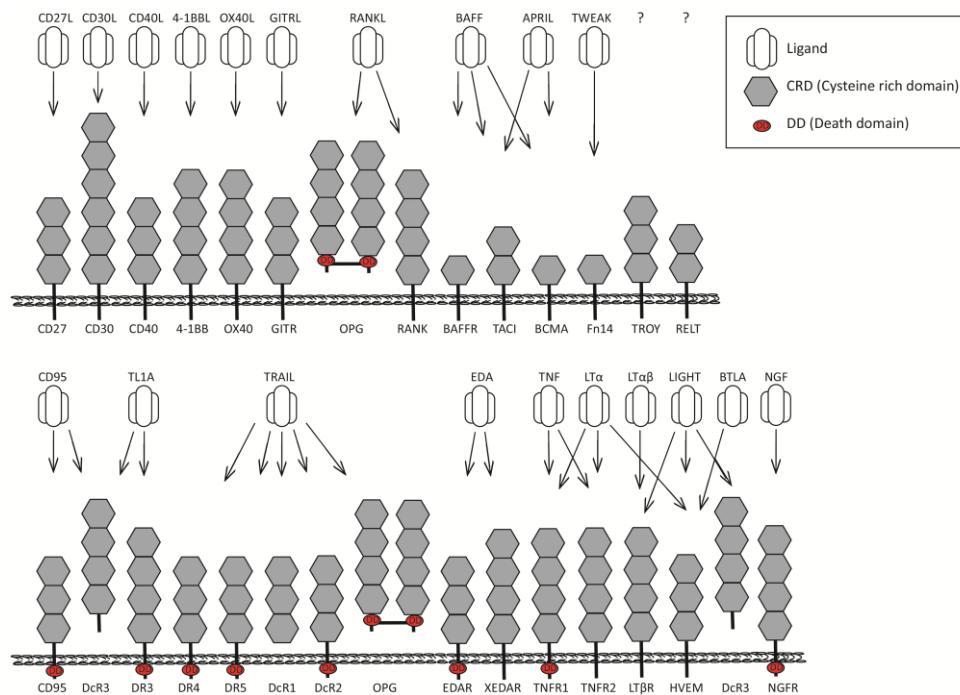


Abbildung 2: Übersicht über die TNF-Rezeptor Superfamilie und ihre Liganden

Die möglichen Interaktionen der Liganden (weiß) mit den verschiedenen TNF-Rezeptoren sind über die Pfeile zu erkennen. Der extrazelluläre Rezeptorteil ist in grau dargestellt und gibt die Anzahl an CRDs wieder. Die cytoplasmatische Todesdomänen sind als rote Ovale abgebildet. Abbildung nach Hehlhans und Pfeffer, 2005.

Da in dieser Arbeit vor allem die inflammatorischen Signalwege NF- κ B, der MAP-Kinasen und Akt, sowie im Speziellen die Rekrutierung von Adapterproteinen an TNFR1 und CD40 während der Signaltransduktion bedeutsam sind, werden die einzelnen Signalwege und diese Rezeptorsysteme in den folgenden Kapiteln vertieft.

1.3.1 Das TNF/TNFR1 System

TNF wird als Typ II Transmembran Protein von 26 kDa membrangebunden gebildet, welches durch die Metalloprotease „*TNF converting enzyme*“ (TACE) in ein lösliches 17 kDa Protein gespalten werden kann. Sowohl lösliches als auch membrangebunenes TNF sind als Trimere bioaktiv. TNF ist ein potentes inflammatorisches Zytokin, welches vor allem auf aktivierten Makrophagen und T-Lymphozyten exprimiert wird. Neben der Wirkung als Mediator von Entzündungsreaktionen ist TNF ein wichtiger Bestandteil der Immunantwort gegenüber intrazellulären Erregern und Parasiten. So kann die Immunabwehr gegenüber Pathogenen durch Neutralisation von TNF stark eingeschränkt werden (43). Lösliches TNF bindet neben TNFR1 auch TNFR2, dabei wird TNFR2 vor allem von membranständigen TNF aktiviert (44). Während das 55 kDa Protein TNFR1 zu den klassischen Todesrezeptoren gehört und sowohl inflammatorisch als auch apoptotisch wirken kann, moduliert TNFR2 überwiegend inflammatorische Signalwege in Immunzellen (45). Das TNFR1 System ist neben der

Modulation von pro- und anti-apoptotischen Signalwegen auch für die Abwehr von intrazellulären Erregern von Bedeutung. Studien mit TNFR1^{-/-}-Mäusen haben gezeigt, dass TNFR1 essenziell für die Bekämpfung von Infektionen mit *Listeria monocytogenes*, *Mycobacterium tuberculosis* und *Salmonella typhimurium* sind (46, 47).

Die pleiotropen Funktionen der TNFR1 Signaltransduktion, sowie die Aktivierung von NF-κB oder die Induktion von Apoptose wird über die charakteristische DD im cytoplasmatischen Teil vermittelt. Nach Bindung von TNF rekrutiert TNFR1 seine Adapterproteine vor allem über die DD. Die Aktivierung anti-apoptotischer Signalkaskaden wie NF-κB und den MAP-Kinasen p38 und JNK erfolgt über die Rekrutierung von RIP1, TRAF2 und cIAP1 und cIAP2 an das Adapterprotein TRADD. Apoptotische Signalwege werden durch den für Todesrezeptoren typischen „*death-inducing signaling complex*“ (DISC) initiiert. Dieser Signalkomplex besteht aus den Adapterproteinen TRADD, FADD und Vorläuferformen der Initiatorcaspase 8 (= Procaspase-8). Die Bildung von DISC ist dabei abhängig von der Internalisierung des Rezeptors (48). Die durch den entstandenen Rezeptorkomplex resultierende räumliche Nähe begünstigt die Dimerisierung der Initiatorcaspasen und die autokatalytische Proteolyse von Procaspase-8. Die Apoptose wird durch die darauffolgende Aktivierung der Effektorcaspasen durch aktive Caspase-8 initiiert (Abb. 3).

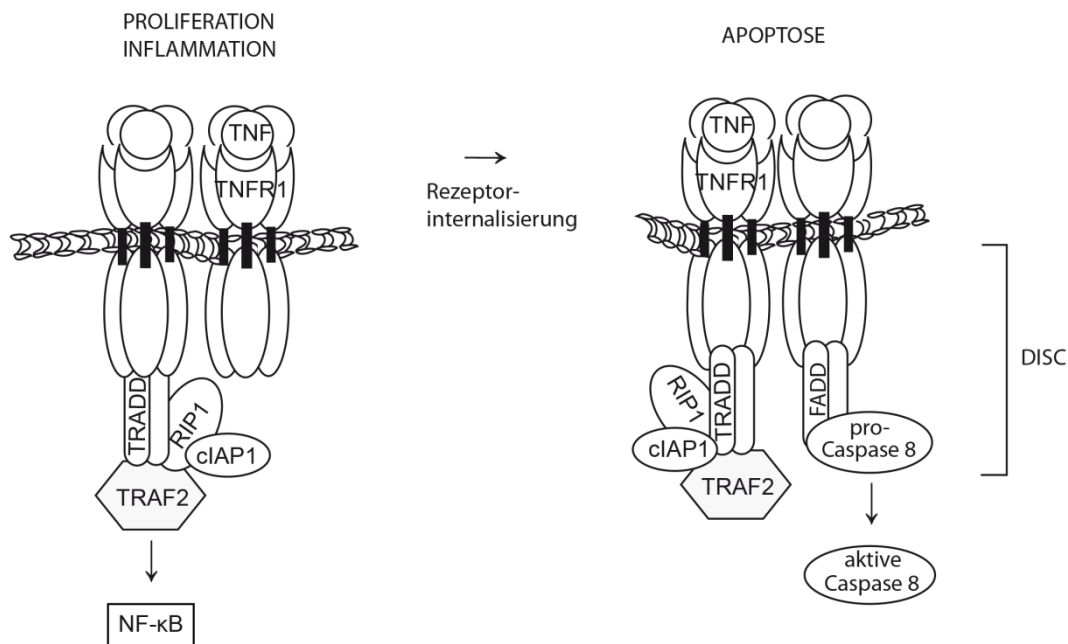


Abbildung 3: TNFR1 Signaltransduktion

Durch die Rekrutierung der Adapterproteine TRADD und RIP1 über die DD von TNFR1 und die anschließende Bindung von TRAF2 und cIAP1/2 werden inflammatorische Signalwege, wie NF-κB aktiviert. Durch die Internalisierung des Rezeptorkomplexes kann der DISC bestehend aus TRADD, FADD und Procaspase-8 gebildet werden. Nachfolgend wird Procaspase-8 autoproteolytisch in aktive Caspase-8 prozessiert und aktiviert die Effektorcaspase-3, die den Zelltod einleitet.

Manche Zelltypen (sog. Typ-II Zellen) benötigen für die Todesrezeptor-vermittelte Apoptoseinduktion einen mitochondrialen Amplifikationsloop. In diesem Fall wird über einen Mitochondrien-assoziierten Signalweg das pro-apoptotische Protein Bid durch Caspase-8 gespalten. Dies führt zur Translokation von tBid („*truncated Bid*“) aus dem Zytoplasma in die mitochondriale Membran, wo es zur Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien kommt. Parallel löst sich Apaf-1 aus der Zellmembran der Mitochondrien und bildet zusammen mit Cytochrom c und Caspase-9 das so genannte Apoptosom. Über das Apoptosom wird Caspase-3 aktiviert und der Zelltod erzwungen (49).

1.3.2 Das CD40L/CD40 System

Der Rezeptor CD40 wurde erstmals auf B-Lymphozyten identifiziert und charakterisiert (50). Daneben wird CD40 konstitutiv auf Monozyten, Makrophagen, Dendritischen Zellen sowie einigen nicht-hematopoetischen Zellen und einigen Tumorzellen exprimiert. Die CD40-abhängige Aktivierung von Zielgenen und die Vermittlung einer funktionellen T- und B-Zell Interaktion sind nötig für die erfolgreiche B-Zell Entwicklung, der Antigen-spezifischen Antikörperproduktion und der Sekretion bestimmter proinflammatorischer Zytokine wie IL-6 und IL-8 (51). CD40 ist zudem ein wichtiger Regulator von Makrophagenfunktionen. So wird während einer Infektion die TNF Produktion durch CD40 induziert (52). Zudem konnte eine

IFN γ unabhängige Aktivierung von Makrophagen über TNF und CD40 Signalwege gezeigt werden (53) (Abb. 4).

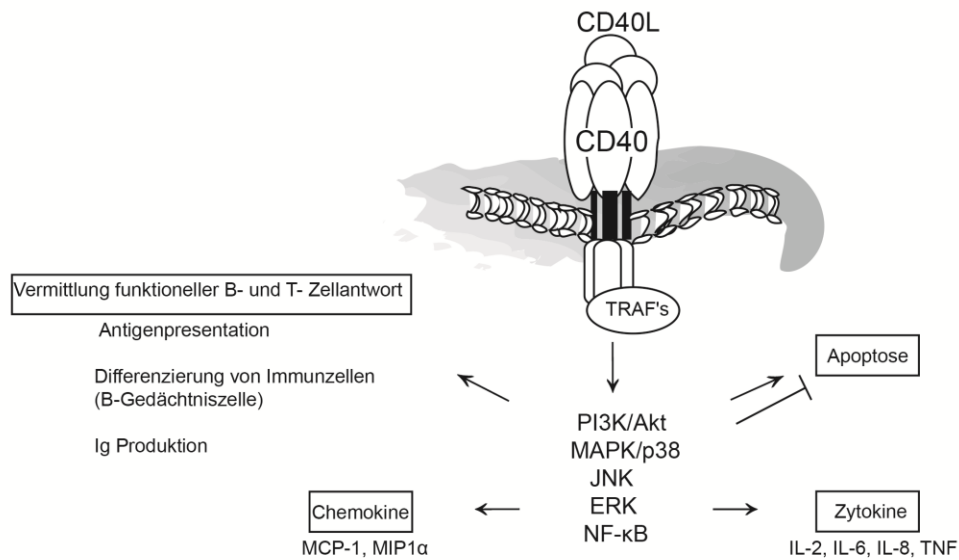


Abbildung 4: Übersicht über das CD40/CD40L-System

Die CD40- abhängige Aktivierung der Signalwege NF- κ B, MAPK und Akt erfolgt über die TRAF-Moleküle. Dadurch moduliert CD40 Funktionen der B- und T- Zellantwort, die Sekretion von Zytokinen und Chemokinen und kann je nach Stimulus für die Zelle pro- oder anti- apoptotisch wirken.

Die Aktivierung von CD40 erfolgt über seinen Ligand CD40L, auch als CD154 bekannt. Neben der 33 kDa Form von CD40L existieren noch weitere kürzere und lösliche Formen des Liganden, die jedoch alle einen homotrimeren Komplex bilden und eine ähnliche Bioaktivität aufweisen (54). CD40L wird vor allem auf CD4⁺ T-Zellen sowie auf B-Zellen exprimiert. Nach Ligandbindung werden an den multimerisierten Rezeptor verschiedene „second messenger“ Systeme initiiert, da der cytoplasmatischen Domäne von CD40 jegliche Kinasen-Aktivität fehlt. Daher werden verschiedene Adapterproteine an CD40 rekrutiert. Die TRAF-Moleküle zählen zu den wichtigsten Adapterproteinen (55). TRAF2, 3 und TRAF6 binden direkt an den Rezeptor. Dabei kompetieren TRAF2 und TRAF3 um eine Bindungsstelle, wohingegen TRAF6 eine eigene, nahe der Membran gelegene Bindungsstelle besitzt (56). TRAF5 assoziiert durch Hetero-Oligomerisierung an TRAF3 und TRAF1 bindet indirekt über TRAF2 an CD40. Diese beiden TRAF-Moleküle spielen in der CD40 Signaltransduktion dabei eine kooperative Rolle (57). Die Aktivierung von Signalwegen wie NF- κ B, die MAPK und PI3K/Akt MAPK Signalwege und des Transkriptionsfaktors NF- κ B erfolgt vor allem über TRAF2 und TRAF6 (58).

1.3.3 NF- κ B Aktivierung

Der Transkriptionsfaktor „*nuclear factor- κ B*“, NF- κ B ist ein wichtiger Modulator der Immunantwort, vor allem in der Zellproliferation und im Entzündungsgeschehen. Dieser Transkriptionsfaktor wird durch Pathogene, Zytokine oder Chemokine aktiviert. Das NF- κ B System besteht aus fünf verschiedenen Untereinheiten p65 (RelA), RelB, cRel, p50 und p52, welche als Dimere in den Kern translozieren und die Transkription verschiedener Zielgene von inflammatorischen Zytokinen, Chemokinen und Adhäsionsproteinen aktiviert. Dabei unterscheidet man zwischen dem klassischen und alternativen Signalweg der NF- κ B Aktivierung. Das in die klassische NF- κ B Aktivierung involvierte RelA/p50 Dimer liegt in unstimulierten Zellen mit durch I κ B maskierter Kernlokalisationssequenz (NLS) bereits als inaktiver tertiärer Signalkomplex im Zytoplasma vor. Im alternativen NF- κ B Signalweg ist die Sequenz für die Translokation in den Kern intramolekular im p100/p52 Dimer maskiert (1). Der klassische NF- κ B Signalweg wird über viele Systeme, wie TLR/IL1R und T-Zell Rezeptor aktiviert (59) und ist im TNFR1 Model gut charakterisiert. Nach der Ligandbindung rekrutiert der trimmerisierte Rezeptorkomplex die Adapterproteine TRADD und RIP1, die beide über ihre Todesdomäne an TNFR1 binden. Nach dieser Bindung assoziiert TRAF2 an den Rezeptorkomplex und katalysiert die Homotrimerisierung und Interaktion von TRADD. Daraufhin formt TRAF2 Komplexe mit cIAP1 und cIAP2. Diese Signalplattform rekrutiert die I κ B Kinase (IKK) bestehend aus den Kinasen IKK α und IKK β und der regulatorischen Untereinheit IKK γ (NEMO). Der IKK-Komplex phosphoryliert I κ B α . Anschließend folgen die Ubiquitinylierung und die proteasomale Degradation von I κ B α . Die Kernlokalisationssequenz des NF- κ B Dimers wird dadurch demaskiert und das nun aktive RelA/p50-Dimer kann in den Kern translozieren (60) (Abb. 5).

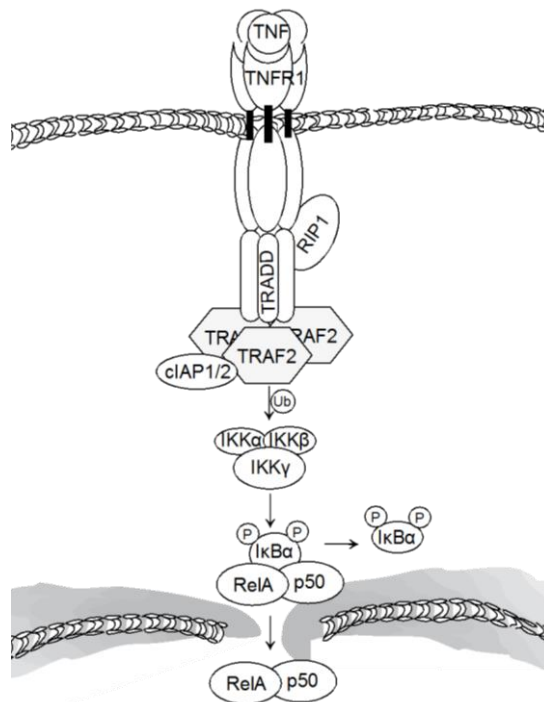


Abbildung 5: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF-κB durch TNFR1 Signaltransduktion

TRADD bindet über die „death domain“ an TNFR1. Anschließend werden die Adapterproteine RIP1, TRAF2 und cIAP1/2 an den Rezeptorkomplex rekrutiert. Dies aktiviert die Kinase IKK die IκBα an zwei Serinen phosphoryliert. Dadurch wird IκBα proteasomal abgebaut und die NLS wird demaskiert. Das NF-κB-Dimer kann in den Kern translozieren und an die DNA binden.

Die Aktivität dieses Signalwegs ist durch verschiedene Feedbackmechanismen streng reguliert. So führt die Translokation von aktivem NF-κB zur Produktion von proinflammatorischen Zytokinen wie TNF und IL-1, die eine zweite autokrine Aktivierungswelle auslösen können (61). Allerdings wird durch Translokation von NF-κB, die Transkription von IκBα aktiviert, was zur Repression der Signaltransduktion führt. Auch das „Ubiquitin editing“ Enzym A20 wirkt negativ regulierend auf die NF-κB Signalkette. Zum einen interagiert A20 direkt mit dem IKK Komplex und reduziert seine Aktivität, zum anderen wird RIP durch A20 zum proteasomalen Abbau markiert (62).

Die Modulation der TNFR1-abhängigen NF-κB Aktivierung wird noch über weitere Adapterproteine bestimmt. So ist das multifunktionelle Protein p62 und die atypische Proteinkinase aPKCγ an der TNFR1-abhängige Signaltransduktion beteiligt. In frühen Arbeiten konnte Sanz et al. zeigen, dass im TNFR1 Signalweg p62 durch die Bindung an aPKCζ in die NF-κB Aktivierung eingreift. Die Proteinkinase aPKCζ ist durch die Aktivierung von IKKβ, einer Untereinheit des IKK, in NF-κB Signaltransduktion involviert. Die Interaktion von p62 mit RIP1 dient als Gerüst für aPKCζ, welches wiederum IKKβ an diesen Komplex bringt. Der Signalkomplex, bestehend aus TNFR1, TRADD, RIP1, p62, aPKCζ und IKKβ, ermöglicht die NF-κB Aktivierung. Fehlt aPKCζ oder p62 im System, beziehungsweise wird die Bindung

von p62 an RIP1 oder an α PKC ζ verhindert, führt dies zur Blockierung der Signalkaskade (11).

Während TNFR1 vor allem die klassische NF- κ B Aktivierung moduliert, wird von CD40 neben diesem Signalweg außerdem noch der alternative NF- κ B Signalweg aktiviert. Die intramolekulare Demaskierung der Kernlokalisationssequenz wird über die Kinase „NF- κ B inducing kinase“ (NIK) induziert. Dabei wird die p100 Untereinheit von NF- κ B zu p52 prozessiert. Im unstimulierten Zustand binden die Adapterproteine TRAF2, TRAF3 und cIAP1 und/oder cIAP2 konstitutiv an NIK. In diesem Komplex induzieren cIAP1/2 eine K48-verknüpfte Ubiquitinylierung, wodurch NIK ständig proteasomal abgebaut wird und somit eine Aktivierung des alternativen NF- κ B Signalwegs verhindert. Nach einer Stimulation mit CD40L wird der TRAF2-TRAF3-cIAP1/2 Komplex zum CD40 Rezeptor rekrutiert. NIK kann im Zytoplasma akkumulieren, da es nicht mehr ubiquitinyliert und abgebaut wird. Daraufhin aktiviert NIK die IKK α Kinasen, wodurch p100 prozessiert und das aktive RelB/p52 Dimer in den Kern translozieren kann (63, 64) (Abb. 6).

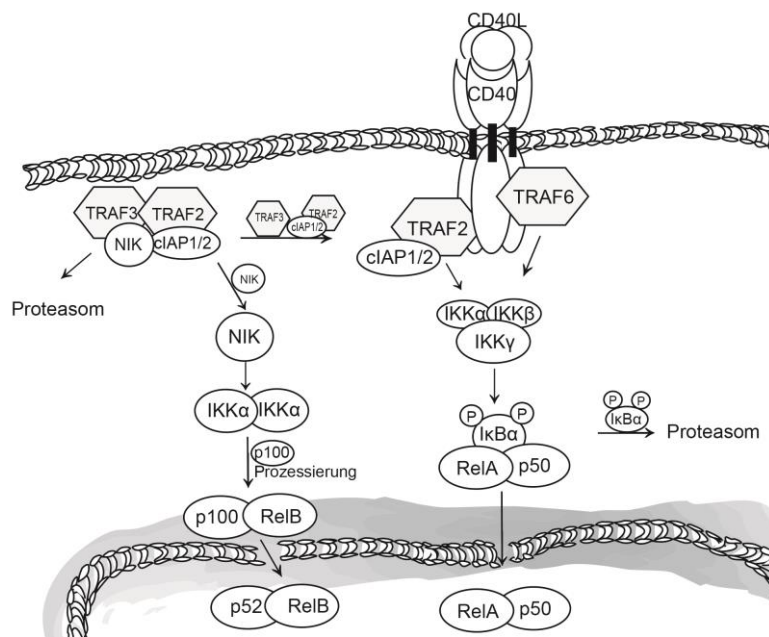


Abbildung 6: Aktivierung des klassischen und alternativen NF- κ B Signalwegs im CD40/CD40L System

Ähnlich der TNF/TNFR1 Signaltransduktion wird NF- κ B durch IKK aktiviert. Nach Bindung von CD40L werden TRAF2 und TRAF6 an den Rezeptor rekrutiert und bilden die Plattform, die IKK ubiquitinyliert und damit aktiviert. Der alternative NF- κ B Signalweg wird indirekt über die Rekrutierung der Adaptermoleküle TRAF2, TRAF3 und cIAP1/2 induziert. Dadurch wird NIK nicht mehr proteasomal abgebaut und kann im Zytosol akkumulieren und nachfolgende Kinasen aktivieren. Diese Kinasen initiieren die Prozessierung des intramolekular inhibierten NF- κ B Dimers.

1.3.4 Die MAPK p38, JNK und ERK

Die mehrstufigen Phosphorylierungskaskaden der MAP-Kinasen werden durch verschiedene Faktoren aktiviert (UV-Licht, oxidativen Stress, Zytokine, Differenzierungs- und Wachstumsfaktoren) und enden in der Familie der MAP-Kinasen p38, JNK und ERK. Diese können wiederum in die Subfamilien ERK (ERK1/2), p38 (p38- α , p38- β , p38- γ , p38- δ) und JNK (JNK1/2/3) unterteilt werden. Eine initiale Aktivierung erfolgt über kleine G-Proteine (Ras, Raf), welche zur Familie der GTPasen zählen. Diese bilden die Grundlage der Signaltransduktionkaskaden, die drei aufeinanderfolgende Proteinkinasen MAP3K, MAP2K, MAPK phosphoryliert und aktiviert (65) (Abb. 7).

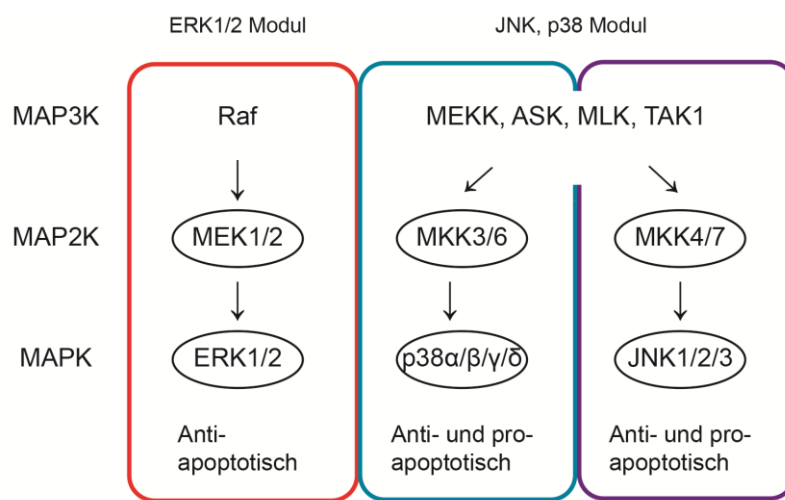


Abbildung 7: Die MAPK Kaskaden

Vereinfachtes Schema der MAPK Signalwege nach Wada und Penninger, 2004. Erläuterungen siehe Text.

Aktive MAPK können in den Nucleus translokalisieren und verschiedene Proteine phosphorylieren, unter anderem auch Transkriptionsfaktoren. MAP-Kinasen aktivieren dadurch Signalwege, die im Zellzyklus, der Immunantwort und bei der Produktion von inflammatorischen Zytokinen beteiligt sind (66). Dabei werden p38 und JNK als typische Stress-Kinasen bezeichnet, die zudem in die Regulation der Apoptose involviert sind. Daher wirken MAPK sowohl pro- als auch anti-apoptotisch, dies ist abhängig von den unterschiedlichen äußeren Einwirkungen auf die Zelle. Beschrieben sind typische zellschädigende Einwirkungen wie Hitzeschock, Bestrahlung aber auch Zytokine wie TNF und NGF die zur Apoptose führen (67). So wurde auch ein TNFR1- und p62- abhängiger apoptotischer Signalweg von Kim et al., beschrieben: In humanen Endothelzellen konnte durch TNF Stimulation eine erhöhte Interaktion zwischen p62 und aPKC ζ beobachtet werden. Die Reduktion von p62 durch siRNA resultierte in der verringerten Aktivierung von aPKC ζ durch TNF Stimulation. Als Folge

wurde JNK-Phosphorylierung reduziert und Caspase-3 vermindert gespalten. Dies beeinflusste direkt die Viabilität der Zellen. So kann p62 und aPKC ζ die TNF induzierte Apoptose modulieren (68).

1.3.5 Der PI3K/Akt Signalweg

Der PI3K/Akt Signalweg moduliert das Überleben der Zelle jenseits von Wachstumsfaktoren, Onkogenen und Zellstress. Die Serin-Threonin Kinase Akt wird durch die vorgeschaltete Aktivierung der Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) aktiviert. Die PI3K werden basierend auf ihrem Substrat in drei verschiedene Klassen und ihre unterschiedliche Isoformen differenziert. Die PI3K katalysiert die Phosphorylierung von Phosphoinositiden in der Zellmembran am Inositolring an der 3'-OH Position und erzeugt aus Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) Phosphatidylinositol-3,4,5-trisphosphat (PIP₃). Für die Aktivierung von Akt (auch Protein Kinase B genannt) ist neben der Bindung an PIP₃, die Phosphorylierung über spezifische Kinasen (PDK1) notwendig (69, 70).

Die Signalwege der MAPK können durch die Akt Proteinkinasen beeinflusst werden. Durch diesen „*crosstalk*“ entsteht die Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Signalwegen. So konnte gezeigt werden, dass p38 und JNK durch Akt Aktivierung inhibiert werden (71). Auch in der CD40 vermittelten Signaltransduktion wird der „*crosstalk*“ von Akt und MAPK beschrieben: Die CD40-abhängige Akt Aktivierung erfolgt über eine TRAF6-abhängige Ubiquitinylierung. Dies ermöglicht die Rekrutierung von Akt zur Membran und die Phosphorylierung durch PDK1. Dabei hängt die CD40-abhängige Akt Aktivierung stark davon ab, ob löslicher oder membrangebundener CD40L zu Verfügung steht. So zeigte eine Studie von Elmetwali et al., dass löslicher CD40L eher die TRAF6-abhängige Ubiquitinylierung von Akt in Karzinomzellen fördert, wohingegen membrangebundener CD40L die Degradation von TRAF6 fördert und die Zellen über die Rekrutierung von TRAF3 an CD40 in die Apoptose gehen. Die Gruppe von Elmetwali hat ein Model vorgeschlagen, in dem die TRAF3-abhängige JNK Phosphorylierung die Aktivierung von Caspase-8 und die anschließende Freisetzung von Cytochrom c aus den Mitochondrien induziert. Nachfolgend wird der Zelltod über die Bildung des Apoptosom und der Aktivierung von Caspase-3/7 initiiert (72).

Summa summarum modulieren p62 und die Vertreter der TNF-Superfamilie TNFR1/TNF und CD40/CD40L das Zellgeschehen über die inflammatorische Signalwege NF- κ B, Akt und MAPK, deren Zusammenwirken über Proliferation, Inflammation oder Apoptose entscheidet.

1.4 Das Adapterprotein TRAF6 in der inflammatorischen Signaltransduktion

Die TRAF Moleküle wurden bereits als Adaptermoleküle der Rezeptoren der TNF Superfamilie erwähnt. Dabei ist TRAF6 als Bindungspartner von p62 und Modulator von TLR/IL-1R- und CD40- abhängiger Aktivierung von MAPK und NF- κ B von Bedeutung. Die TRAF-Moleküle bestehen aus einer hochkonservierten „*coiled-coil*“ TRAF-Domäne, die Rezeptor-Bindung, Interaktionen mit Adapterproteinen und Assoziation zu anderen TRAF Molekülen ermöglichen. Mit Ausnahme von TRAF-1 besitzen alle TRAF-Moleküle eine RING-Finger Domäne gefolgt von einer variablen Anzahl von Zink-Finger Regionen (ZZ). Die RING-Finger Domäne findet sich bei vielen E3 Ubiquitin Ligasen und stellt deren katalytische Domäne dar. Die Ubiquitinylierung hat sich als Schlüsselmechanismus der TRAF-abhängigen Signaltransduktion erwiesen. Eine Ubiquitinylierung verläuft über eine ATP-abhängige Enzymkaskade. Diese bestehen aus dem Ubiquitin- (Ub) aktivierenden Enzym (E1), dem Ub-konjugierenden Enzym (E2) und der Ub-Ligase (E3). Die TRAF Moleküle stimulieren Protein-Protein Interaktionen durch K63-verknüpfte Polyubiquitin Ketten über die E2-Enzyme UBE2D3 und UBC13–UEV1A. Dieser Mechanismus wird über „*Ubiquitin editing*“ Enzyme wie CLYD oder A20 moduliert. Diese spalten K63-verknüpfte Ub-Ketten und die Proteine werden durch K48-Ubiquitinylierung zum proteasomalen Abbau markiert (73, 74).

In der TLR/IL-1R Signaltransduktion spielt TRAF6 eine Schlüsselrolle in der Aktivierung von NF- κ B und der MAPK. Beide Rezeptorsysteme binden das Adapterprotein MyD88 über die „*Toll-/IL-1-receptor*“ (TIR) Domäne. Nach Bindung des Liganden und Assoziation von MyD88 an den Rezeptor über die C-terminale TIR Domäne rekrutiert MyD88 die IL-1-Rezeptor-assoziierten Kinasen (IRAK) 4 und IRAK1. Aktiviertes IRAK1 interagiert mit TRAF6 und fördert dessen Oligomerisierung. Die Oligomerisierung ist ein kritischer Faktor für die E3-Ligasen Aktivität von TRAF6. Zusammen mit dem E2-Enzym Ubc13 können die Zielproteine über eine K63-Ubiquitinylierung markiert und aktiviert werden. TRAF6 moduliert die nachfolgenden Signalwege von MAP-Kinasen oder aktiviert NF- κ B über den TAK1/TAB Komplex (75, 76) (Abb. 8).

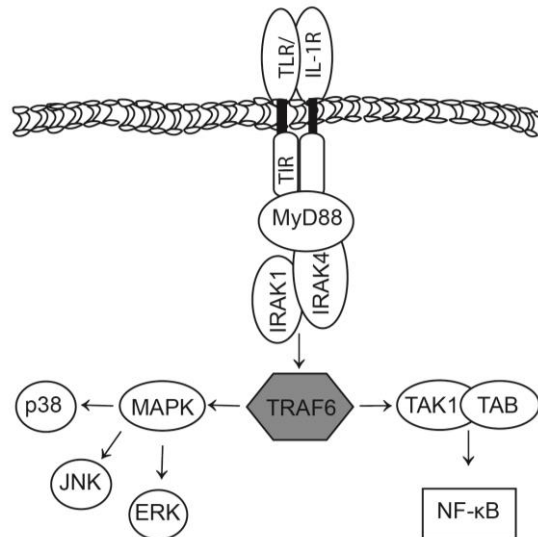


Abbildung 8: Schema der Signaltransduktion des TLR/IL-1R- Systems über MyD88 und TRAF6

TLRs und IL-1R rekrutieren MyD88. Wird diese Signalplattform aktiviert, können IL-1-Rezeptor assoziierte Kinasen (IRAK) an MyD88 binden und aktivieren sich durch Autophosphorylierung selbst. Die Bindung von TRAF6 fördert dessen Oligomerisierung und Aktivierung durch Autoubiquitinierung. TRAF6 kann dann Transkriptionsfaktoren wie NF-κB und Vertreter der MAPK wie JNK, p38 und ERK aktivieren

Ein Zusammenhang zwischen p62 und dem IL-1R Signalweg wurde von Sanz, et al., beschrieben. So konnte die Gruppe durch die Transfektion eines p62-„antisense“-Konstrukts eine verminderte NF-κB Aktivierung über IL-1 Stimulation beobachten. Zudem wurde in einem Überexpressionssystem über Immunpräzipitationsversuche nachgewiesen, dass p62 über TRAF6 in diesen Signalweg eingreift (12). Eine neuere Studie zeigte, dass p62 neben der Histondeacetylase 6 (HDAC6) für die Aggregation und Akkumulation von endogenem MyD88 und der damit verbundenen autophagosomalen Degradation des Proteinkomplexes verantwortlich ist. Hier wirkte p62 über seine Ubiquitin-Bindungsregionen negativ regulierend auf den polyubiquitinylierten MyD88-TRAF6 Signalkomplex und hatte einen suppressiven Effekt auf die Signaltransduktion von JNK und p38 in RAW264.7 Makrophagen (77).

Auch TNF Familienmitglied „Receptor Activator of NF-κB“ (RANK) interagiert über TRAF6 mit p62. Das RANK System reguliert vor allem die Differenzierung und Aktivierung von Osteoklasten. Duran et al. konnten zeigen, dass eine RANK-Ligand Stimulation in p62-defizienten BMDMs zu einer frühen NF-κB-Aktivierung (15-30 min) führte. Diese Zellen wiesen allerdings eine stark geminderte NF-κB Langzeitaktivierung im Vergleich zu wt BMDMs auf (78). Dabei spielt in Osteoklasten die Bildung eines Multiproteinkomplexes bestehend aus p62, TRAF6 und aPKCζ nach der RANK Stimulation für die Aktivierung von NF-κB eine zentrale Rolle. So wird durch eine Mutation am C-terminus von p62 die IκBα Degradierung beeinflusst (79).

Neben RANK moduliert auch CD40 inflammatorische Signalwege über TRAF6 sowie TRAF2. Eine Funktion von p62 wurde in diesem Rezeptorsystem bislang noch nicht untersucht. Die relativ kurze zytoplasmatische Domäne (62 Aminosäuren in humanen CD40) und die Erkenntnisse aus Röntgenkristallstrukturanalysen kommen zu dem Schluss, dass jeweils nur ein TRAF-Molekül an den Rezeptor binden kann. Daher kompetieren TRAF2 und TRAF6 um die Bindung, trotz unterschiedlichen Bindungsstellen am Rezeptor. Aus diesem Grund wurde der Einfluss der TRAF Moleküle auf die CD40-abhängigen Signalwege anhand von Überexpressionsmodellen mit dominant-negativ wirkenden TRAF Molekülen oder mit Hilfe von CD40-Rezeptormutanten, mit fehlender Bindungsstelle für unterschiedliche TRAF Proteine, untersucht. Die Ergebnisse dieser Studien variierten jedoch stark in den unterschiedlichen Zellmodellen. So wird TRAF6 als kritischer Faktor des MAPK Signalweges angesehen (80). Zudem wurde in Endothel-Zellen und Müller-Zellen die proinflammatorische Antwort durch eine unterbrochene CD40-TRAF6 Signaltransduktion vermindert (81). Andererseits zeigten Arbeiten mit CD40 Rezeptormutanten, bei einer mutierten TRAF6 Bindungsstelle, keine Auswirkung auf die p38, JNK und NF- κ B Aktivierung durch CD40 Stimulation in B-Zellen (82). Diese Diskrepanzen sind teilweise durch die unterschiedliche Stimulation (agonistischer CD40 Antikörper, CD40L), als auch über die Verwendung verschiedenen Zellmodelle (unterschiedliche TRAF Expressionslevel) erklärbar (58). Die Rolle von TRAF6 ist weiterhin noch nicht vollständig entschlüsselt. Neben der unabhängigen Aktivierung dieser Signalwege wirkt TRAF6 auch unterstützend auf TRAF2 bei fehlender Rezeptorbindungsstelle. So konnten Davies et al. in Fibroblasten zeigen, dass bei der Deletion der TRAF6 Bindungsstelle an CD40, TRAF6 auch durch Assoziation an TRAF2 die Signaltransduktion regulieren kann (83).

Zusammenfassend zeigen diese Befunde, dass TRAF6 ein wichtiges Intermediat für die NF- κ B Aktivierung der p62-abhängigen Systeme wie RANK/RANKL und TLR/IL1R ist. Zudem bindet auch CD40 das Adapterprotein TRAF6, dabei wurde die Rolle von p62 in CD40 bislang noch nicht untersucht.

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Makrophagen sind wichtige Intermediate in der Erregerabwehr und in der inflammatorischen Immunantwort. Die Funktionen von Makrophagen, neben der Phagozytose und Antigen-Präsentation, zur Produktion von verschiedenen Zytokinen ist dabei eng an das TNF/TNFR- und CD40L/CD40- System gekoppelt, wobei p62, wie oben dargestellt in beiden Signalkaskaden involviert ist. Eine Neutralisation von TNF schränkt die Erregerabwehr empfindlich ein. Zudem verläuft eine Listerieninfektion in TNFR1^{-/-} Mäusen letal, da die Signaltransduktionswege über TNFR1 essentiell für die Eradikation des Erregers in Makrophagen sind (43, 47). Daher sollte der Einfluss von p62, als am Infektionsgeschehen beteiligtes Protein (26) und als Modulator von TNFR1-abhängigen Signalwegen (11), im Kontext einer Listerieninfektion, untersucht werden. Zusätzlich sollte anhand der Aktivierung von NF-κB-, MAPK- und Akt-Signalwegen geklärt werden, inwiefern p62 über aPKCζ die allgemeine TNFR1 Signaltransduktion in Makrophagen moduliert. Während des Infektionsgeschehens wird die Sekretion des hochwirksamen Zytokins IL-1β in einem mehrstufigen Prozess durch NF-κB Aktivierung initiiert. Dabei ist p62 neben der möglichen Modulation von TNFR1-abhängigen Signalwegen auch an der Signaltransduktion von TLRs über das Adapterproteins TRAF6 beteiligt. Auch das CD40/CD40L System moduliert seine inflammatorische Signaltransduktion über TRAF6 (84). Eine Interaktion zwischen p62 und dem CD40 Rezeptorsystem ist daher über das Adapterprotein TRAF6 möglich und wurde näher untersucht. Dafür wurden der Signalkomplex und die Aktivierung von NF-κB in einer Makrophagenzelllinie und in einer Tumorzelllinie analysiert.

2. Materialien:

2.1 Geräte

Alpha Imager HP

CO₂Begasungsbrutschrank Hera® cell 240

Durchflusszytometer FACS Canto II

Fotometer Microplate Reader 686

INTAS Chemilux Geldokumentationseinheit

Keyence BZ-9000 Fluoreszenz-Mikroskop

Laminar Flow Einheit (Antiar BSK)

Lichtmikroskop

Tecan Hydro Flex™ Microplate Washer

Thermomixer

Ultraschallbad (Diagenode Bioruptor®)

Zentrifuge Eppendorf 5417R

Zentrifuge Eppendorf 5804R

Proteinsimple, San Jose,

California (USA)

Heraeus, Hanau (DE)

BD, Heidelberg (DE)

Bio Rad, München (DE)

INTAS, Göttingen (DE)

Keyence, Neu-Isenburg (DE)

Haereus GmbH, Osterode (DE)

Leica, Wetzlar (DE)

Tecan, Crailsheim (DE)

Eppendorf, Hamburg (DE)

Diagenode, Seraing (BE)

Eppendorf, Hamburg (DE)

Eppendorf, Hamburg (DE)

2.2 Verbrauchsmaterialien

Eppendorf Cups (1,5 mL, 2 mL)

Filterspitzen (10 µL, 20 µL, 100 µL, 200 µL, 1000 µL)

Impfösen

Kanülen (27 G, 20 G)

Lab-Tek® Chamber Slides™

Polypropylenröhrchen (15 mL, 50 mL)

PVDV-Membran

Spritzen (10 mL, 20 mL)

Sterilin Square plates

Zellkulturflaschen (25 cm², 75 cm², 175 cm²)

Zellkulturschalen (6 cm, 10 cm, 15 cm)

Zellschaber (25 cm)

Eppendorf, Hamburg (DE)

Biozym, Hessisch Oldendorf (DE)

VWR, Darmstadt (DE)

BD, Heidelberg (DE)

Sigma-Aldrich-Aldrich, Steinheim (DE)

BD, Heidelberg (DE)

Peqlab, Erlangen (DE)

BD, Heidelberg (DE)

Sterilin Limited®, Cambridge (UK)

BD, Heidelberg (DE)

BD, Heidelberg (DE)

Sarstedt, Nümbrecht (DE)

Zellsieb (100 µm)	BD, Heidelberg (DE)
6-well Platten	BD, Heidelberg (DE)
96-well Platten, Flachboden	BD, Heidelberg (DE)
96-well Maxi-Sorb Nunc-Immunoplate	Thermo Scientific, Schwerte (DE)

2.3 Chemikalien, Medien und Reagenzien

Acrylamid	AppliChem, Darmstadt (DE)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
CD40 Ligand, rekombinant, human und murin	Immuno Tools, Friesoythe (DE)
Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Thermo Scientific
Dimethylsulfoxid (DMSO)	AppliChem, Darmstadt (DE)
ELISA Substrat Reagenz A und B	BD, Heidelberg (DE)
Ethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Fötale Kälberserum (FCS)	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Interferon γ , rekombinant, murin	Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Mercaptoethanol für Zellkultur	Gibco, Invitrogen, Karlsruhe (DE)
Methanol	Merck, Darmstadt (DE)
Milchpulver	Heirler, Radolfzell (DE)
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Natriumorthovanadat	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Nonident-40	AppliChem, Darmstadt (DE)
Phosphataseinhibitorcocktail- 1 und -2	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
2-Propanol	Merck, Darmstadt (DE)
Protease-Inhibitor „complete“	Roche, Mannheim (DE)
Protein G Agarose	Roche, Mannheim (DE)
Protein Marker (prestained 10-250 kDA)	Thermo Scientific, Schwerte (DE)
Roti-Block (10x)	Roth, Karlsruhe (DE)
RPMI1640/1640 Medium	PAA, Pasching (AT)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
TNF, rekombinant, human	Prof. Männel, Regensburg (DE)
Triton-X	Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)
Tris	Affimetrix, Santa Clara (USA)

Trypsin/EDTA Lösung

Tween-20

Östradiol (E2)

PAA, Pasching (AT)

Merck, Darmstadt (DE)

Sigma-Aldrich, Steinheim (DE)

2.4 Puffer und Lösungen

Bezeichnung	Zusammensetzung
Blotpuffer	0,025 M Tris 0,192 M Glycin 10 % (v/v) Methanol
Blockpuffer	TBS-T + 5 % (w/v) Milchpulver
ELISA Coating Puffer	0,1 M Natriumcarbonat pH 9,5
ELISA Waschpuffer	PBS + 0,05 % (v/v) Tween 20
ELISA Probenpuffer	PBS + 10 % (v/v) FCS
ELISA Stop-Lösung	2 N Schwefelsäure
Erythrozyten-Lysepuffer	150 mM Ammoniumchlorid 1 mM Kaliumhydrogencarbonat 0,1 mM Natriumethyldiamintetraacetat pH 7,2-7,4
FACS-Puffer	PBS + 1 % (v/v) FCS 1mg/mL Natriumazid
MCBL Lysepuffer	50 mM Tris 150 mM Natriumchlorid 0,5% (v/v) Nonident-40
PBS	0,02 M Natriumphosphat 0,7 % (w/v) Natriumchlorid pH 7,2
PBS-T	PBS + 0,05 % (v/v) Tween 20
TBS (Tris buffered saline)	0,02 M Tris 0,8 % (w/v) Natriumchlorid pH 7,8
TBS-T	TBS+ 0,05 % (v/v) Tween 20
Probenpuffer (SDS 4x konzentriert)	0,25 M Tris,

	8 % (w/v) SDS 40 % (v/v) Glycerol 20 % (v/v) 2-Mercaptoethanol 0,004 % (w/v) Bromphenolblau
SDS-PAGE Laufpuffer	0,025 M Tris 0,192 M Glycin 1 % (w/v) SDS

2.5 Antikörper

Liste der Antikörper, die für Immunblots eingesetzt wurde:

Anti-Tubulin- α Ab-2	Maus	monoklonal	Neomarkers, Fremont (USA)
Anti-GAPDH	Maus	monoklonal	Abcam, Cambridge (UK)
Anti-p62	Kaninchen	monoklonal	Sigma Aldrich, Steinheim (DE)
Anti-IkBa	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling, Beverly (USA)
Anti-phospho-IkBa	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling, Beverly (USA)
Anti-p38	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling, Beverly (USA)
Anti-phospho-p38	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling, Beverly (USA)
Anti-Akt	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling, Beverly (USA)
Anti-phospho Akt (Ser473)	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling, Beverly (USA)
Anti-ERK	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling, Beverly (USA)
Anti-phospho ERK	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling, Beverly (USA)
Anti-NF- κ B2 p100/p52	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling, Beverly (USA)
Anti-CD40	Kaninchen	monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg (DE)
Anti-TRAF6	Kaninchen	polyklonal	Santa Cruz, Heidelberg (DE)
Anti-TRAF2	Kaninchen	monoklonal	Cell Signaling, Beverly (USA)
Anti-aPKC ζ	Maus	monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg (DE)
Anti-IKK γ	Maus	monoklonal	Santa Cruz, Heidelberg (DE)

Liste der Antikörper, die für FACS-Färbung eingesetzt wurde:

Fc Block™, Anti-mouse	Ratte	monoklonal	BD, Heidelberg (DE)
CD16/CD32 Clone: 2.4G2			
FITC Anti-mouse Ly-6G	Ratte	monoklonal	BD, Heidelberg (DE)
FITC Anti-Rat IgG2a, κ	Ratte	monoklonal	BD, Heidelberg (DE)

FITC Anti-mouse CD11c	Hamster	monoklonal	BD, Heidelberg (DE)
FITC hamster IgG1, λ 2	Hamster	monoklonal	BD, Heidelberg (DE)
Biotin Anti-mouse CD11b	Ratte	monoklonal	BD, Heidelberg (DE)
PE Anti-mouse CD40	Ratte	monoklonal	BD, Heidelberg (DE)
PE Anti-Rat IgG2a, κ	Ratte	monoklonal	BD, Heidelberg (DE)
APC Anti-mouse CD45	Ratte	monoklonal	BD, Heidelberg (DE)
APC Anti-Rat IgG2b, κ	Ratte	monoklonal	BD, Heidelberg (DE)
APC Anti-mouse F4/80	Ratte	monoklonal	Affimetrix, Santa Clara (USA)
APC Anti-Rat IgG2a, κ	Ratte	monoklonal	Affimetrix, Santa Clara (USA)
APC Anti-Human CD40	Maus	monoklonal	Miltenyi, Bergisch-Gladbach (DE)

2.6 Kits:

Diff-Quick Färbeset	Medion Diagnostics, Düdingen (CH)
QIAGEN Plasmid Midi Kit	Qiagen, Venlo (NE)
OptEIA™ human IL8-ELISA Kit	BD, Heidelberg (DE)
OptEIA™ human IL6-ELISA Kit	BD, Heidelberg (DE)
OptEIA™ murin TNF-ELISA Kit	BD, Heidelberg (DE)
OptEIA™ murin IL1 β -ELISA Kit	BD, Heidelberg (DE)
OptEIA™ murin IL6-ELISA Kit	BD, Heidelberg (DE)

2.7 Mauslinien, Bakterien und Zelllinien

Die verwendete Mauslinien p62^{-/-} C57BL/6, wt C57BL/6, p62 Δ ST Deletionsmutante C57BL/6 und die heterozygote Wurfgeschwisterkontrolle p62 Δ SThe C57BL/6 wurden von Prof. Dr. André Gessner zur Verfügung gestellt. Die genetische Mutation der p62 Δ ST Deletionsmutante bezieht sich auf eine Deletion der Aminosäuren 69-251 und exprimiert eine verkürzte Form des Proteins. Die Maus wurde in der Doktorarbeit von Susanne Bürgis (Friedrich-Alexander-Universität, Erlangen-Nürnberg) charakterisiert (85).

Die für die bakteriellen Wachstumskurven verwendete EGDe Wildtyp-Stamm *Listeria monocytogenes* waren ein Geschenk von Dr. J. Stritzker, Würzburg.

Verwendete Zelllinien:

Bezeichnung	Quelle
786-O Nieren-Adenokarzinomzelllinie	Prof. Dr. H. Wajant, Universität Würzburg
HEK 293T Zellen	DSMZ
Phoenix-GP	Prof. Dr. André Gessner, Universität Regensburg
L929 Fibrosarkomzelllinie	DSMZ
CHO-Zellen (SCF-Produzenten)	Prof. Dr. D. Männel, Universität Regensburg

2.8 Software

Sämtliche Abbildungen wurden mit Adobe Illustrator CS2 angefertigt. Graphen wurden mit Hilfe von GraphPad Prism 5 gestaltet. Für die Auswertungen der Durchflusseperimente wurde FlowJo (Version 7) verwendet. Die ELISA Quantifizierung erfolgte über die Software Microplate Manager.

3. Methoden:

3.1 Zellkultur

Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen unter einem Laminar Flow gehandhabt und in einem Heraeus Zell Inkubator bei 37 °C, 5 % CO₂ und 100 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Die aus Knochenmarkszellen generierte Hoxb8 immortalisierte Progenitor-Stammzelllinie wurde in RPMI1640 angereichert mit 10 % (v/v) fötalem Kälberserum (FCS), 1 % (v/v) L-Glutamin und 30 µM β-Mercaptoethanol (2-ME) sowie 1 µM Östradiol (E2) und der Stamm-Zell-Faktor (SCF) enthaltene Überstand (1:25) in unbeschichteten Schalen kultiviert. Dabei wurden 3x10⁵ Zellen/Well im 6-well Format ausgesät und das Medium mindestens alle 3 Tage erneuert. Die Zelllinie 786-O wurde in RPMI1640 Medium, supplementiert mit 10 % FCS kultiviert. Bei etwa 80-90 % Konfluenz wurde der Zellrasen mittels Trypsin (0,025 %) und EDTA (10 mM) abgelöst, abzentrifugiert und im Verhältnis 1:5 bis 1:10 gesplittet.

Um SCF enthaltenen Überstand zu gewinnen, wurden 3x10⁵ CHO-Zellen in 15 cm Schalen in 18 mL RPMI1640 Medium (10 % FCS) ausgesät und für 5 Tage in Kultur genommen. Der Mediumsüberstand wurde abgenommen, durch einen 0,22 µm Filter sterilfiltriert, aliquotiert und bei -20 °C aufbewahrt.

Für die Gewinnung von M-CSF enthalten Überstand wurde die stark M-CSF exprimierende Zelllinie L929 verwendet. Dafür wurden 7x10⁵ Zellen in 175 cm² Flaschen ausgesät (DMEM, 10 % FCS). Nach sieben Tagen wurde der Überstand abgenommen sterilfiltriert, portioniert und bis zur Stimulation bei -20 °C weggefroren. Um BMDM-Medium zu erstellen wurde DMEM mit 10 % FCS und 10 % (v/v) M-CSF angereichert.

Die Zellzahl vor dem Aussähen wurde durch das Auszählen über eine Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die Zellen wurden in regelmäßigen Abständen auf Mykoplasmen untersucht.

3.2 Kultivierung von Bakterien

Um *Listeria monocytogenes* (Wildtyp Stamm EGDe) zu kultivieren, wurde eine Kolonie von einer Blutagar Platte genommen und in 4 mL BHI-Medium über Nacht bei 37 °C bebrütet. Die Kultur wurde in frischem BHI-Medium 1:10 verdünnt und für 3 h bei 37 °C und 100 rpm geschüttelt. Um die Zelldichte der Bakteriensuspension zu bestimmen, wurden die Bakterien zweimal mit PBS (3000 rpm, 5 min) gewaschen, in PBS aufgenommen und die OD₆₀₀ bestimmt.

3.3 Erstellung von Knochenmarksmakrophagen (BMDM)

Zur Gewinnung von Knochenmarkszellen wurden wt C57BL/6-Mäuse und p62^{-/-} C57BL/6-Mäuse verwendet. Die Mäuse wurden durch zervikale Dislokation getötet und der Femur- und Tibiaknochen herauspräpariert. Die darauffolgenden Schritte wurden unter der Sterilbank durchgeführt. Nach Öffnung des Knochenmarkskanals wurden die Knochenzellen mit Hilfe einer Spritze mit eiskaltem PBS durch ein Zielsieb (100 µm) in ein 50 mL Falcon Röhrchen gespült. Die gewonnenen Zellen wurden bei 300 x g für 8 min bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden im Rücklauf resuspendiert. Um die verbleibenden Erythrozyten zu lysieren wurde 5 ml Erythrozyten-Lysepuffer hinzugegeben und sofort bei selben Bedingungen zentrifugiert. Das Zellpellet wurde dreimal mit PBS gewaschen, in BMDM-Medium resuspendiert und auf eine beschichtete Zellkulturschale ausgesät. BMDM-Medium mit M-CSF Zusatz führt zur Reifung der Progenitorzellen zu Makrophagen (86). Um unreife Progenitorzellen von adhärenenten Fibroblasten zu trennen wurde der Überstand am nächsten Tag in eine neue unbeschichtete Zellkulturschale mit BMDM-Medium überführt und die festsitzenden Fibroblasten verworfen. Nach sieben Tagen Ausdifferenzierung konnten die Makrophagen geerntet und für die Bestimmung der bakteriellen Wachstumskurven nach einer Listerieninfektion eingesetzt werden. Die Expression von typischen Oberflächenrezeptoren von Makrophagen wurde über Durchflussszytometrie kontrolliert.

3.4 Bestimmung der bakteriellen Replikation von *Listeria monocytogenes* in BMDM

Für die Untersuchung der bakteriellen Wachstumskurven von *Listeria monocytogenes* in BMDM von wt C57BL/6-Mäusen und p62^{-/-} C57BL/6-Mäusen wurde ein modifiziertes Protokoll von Singh et al. angewendet (87). Pro Stimulation und untersuchtem Zeitpunkt wurden am Vortag 1x10⁵ BMDM in Triplikaten in ein 96-well ausgesät. Die IFNγ Gruppe wurden über Nacht mit 200 U/mL IFNγ stimuliert. Die TNF-stimulierte Gruppe wurde eine Stunde vor der Infektion mit 100 ng/mL hTNF stimuliert. Zusätzlich wurde eine unstimulierte Mediumkontrolle mitgeführt. Die Zellen wurden mit dem Wildtyp-Listerien Stamm EGDe mit einer MOI von 1 infiziert und für 500 x g für 5 min bei 15 °C zentrifugiert um die bakterielle Aufnahme der Zellen zu fördern. Die Zellen wurden für 30 min bei 37 °C infiziert. Danach wurde der Überstand abgenommen und 100 µL Medium mit Gentamycin (50 µg/mL) auf die Zellen gegeben um etwaige verbliebene extrazelluläre Bakterien abzutöten. Nach 30 min wurde mit Medium gewaschen und Kulturmedium auf die Zellen gegeben und für die unter-

schiedliche Zeitspannen inkubiert. Um die von der Zelle aufgenommenen Bakterien zu quantifizieren, wurden die Zellen nach Abnahme des Mediums mit einer wässrigen 5 % Saponinlösung lysiert. Das Lysat wurde in einer Verdünnungsreihe auf Blutplatten ausplattiert und bei 37 °C bebrütet. Am nächsten Tag konnten die koloniebildenden Einheiten (KBE) ausgezählt werden.

3.5 Erstellung und Differenzierung konditionierte ER-Hoxb8 Stammzelllinie

Da die Gewinnung von Knochenmarksmakrophagen aus der Maus eine hohe Tieranzahl mit geringen Ausbeuten bedeutet und sehr zeitaufwendig ist, wurde eine vergleichbare Makrophagen-Zelllinie aus Knochenmarkszellen generiert. Durch die retrovirale Transfektion eines unter einem Östrogen-Promotor stehenden Hoxb8-Gens wurden die nativen Knochenmarkszellen immortalisiert. Das dafür verwendete 3HA-ERHBH-HoxB8-Neo Plasmid und das ecotrope Helferplasmid wurden von Georg Häcker (St. Jude Children's Research Hospital, Memphis, USA) zur Verfügung gestellt. Unter Östrogenentzug und der Zugabe des Makrophagen-stimulierenden Faktors M-CSF konnten diese immortalisierten Progenitorzellen dann zu Makrophagen ausdifferenziert werden.

Für die Virusproduktion wurden 2×10^6 Phoenix-GP Zellen (basierend auf 293T-Zellen, mit gesteigerter Transfektionsrate) am Vortag in 10 cm Zellkulturschalen ausgesät. Eine Stunde vor der Transfektion wurde das Medium abgenommen und durch DMEM ersetzt. 5 µg des 3HA-ERHBH-HoxB8-Neo Plasmids und 5 µg des ecotropen Verpackungsplasmids (88) (Wirtsbereich beschränkt sich auf Maus und Ratte) wurden in 1 mL DMEM für 20 min inkubiert. Nach der Zugabe von 25 µL PEI wurde durchgemischt und nochmals für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zudem wurde eine Kontrolle mitgeführt, in der nur das Verpackungsplasmid transfiziert wurde. Die Zellen wurden mit dem DNA-PEI-Gemisch transfiziert und nach 6 h wurde das Medium (DMEM, 10 % FCS) gewechselt. Die Ernte des Virusüberstandes erfolgte nach zwei Tagen. Der Überstand wurde mit 4 µg/ml Polybrene versetzt und durch einen 0,45 µm Spritzenfilter in ein frisches 50 ml Falcon überführt. Polybrene verhindert die Ladungsabstoßung zwischen negativ geladenen Viruspartikeln und negativ geladenen Bestandteile der Zellmembran und erhöht dadurch die Infektionseffizienz.

Die Knochenmarkszellen aus wt C57BL/6-, p62^{-/-} C57BL/6- sowie p62^{ΔST} C57BL/6-Mäusen und Wildtyp Wurfgeschwister wurden wie in Kapitel 3.3. beschrieben aus der Maus gewonnen und für zwei Tage mit RPMI1640, angereichert mit 15 % FCS, 10 ng/ml murines Inter-

leukin-3, 10 ng/ml murines Interleukin-6 und SCF (1:25) kultiviert. Der Zusatz von Interleukin-3 und -6 fördert dabei die Expansion der Progenitorzellen. Am Tag der Infektion wurden je 2×10^6 Zellen pro 6-well in 500 μ l Optimem, angereichert mit 1 % L-Glutamat, 10 % FCS, und 30 μ M 2-ME, ausgesät. Die Zellen wurden mit 3 ml Virusüberstand infiziert und für 3 h bei 32 °C und 1300 x g zentrifugiert. Anschließend wurden 3 ml Optimem (1 % L-Glutamin, 10 % FCS, 30 μ M 2-ME) mit den Zusätzen SCF (1:25) und 1 μ M E2 hinzugegeben. Nach etwa 14 Tagen in Kultur waren die Progenitorzellen (MØP) ausgereift und konnten zu Makrophagen (M-MØP) ausdifferenziert werden. Dazu wurden die Zellen dreimal mit PBS, 10 % FCS gewaschen, um das Östrogen aus dem Medium zu entfernen. Anschließend wurden die Zellen in RPMI1640-Medium, 10 % M-CSF in der benötigten Zellzahl auf unbeschichteten Platten ausgesät. Nach 5 Tagen Ausdifferenzierung konnten die ausgereiften M-MØP zur Charakterisierung und für die Stimulationsexperimente eingesetzt werden. Dazu wurden die Zellen mit 200 U/mL mIFN γ über Nacht stimuliert, um aktivierte Makrophagen zu erhalten.

3.6 Mikroskopie

Für die Charakterisierung der Hoxb8-Makrophagen wurde 2×10^4 Progenitorzellen MØP auf Lab-Tek® Chamber Slides™ in M-CSF-haltigen Medium ausgesät. Die Ausdifferenzierung der Zellen wurde durch Anfärben täglich dokumentiert. Die Färbung der Zellen wurde mit einem Diff-Quick Färbeset durchgeführt. Dabei handelt es sich um eine Variante der Romanowski Färbung. Die Färbung wurde nach Herstellerangaben durchgeführt. Die Aufnahmen wurden am Keyence Fluoreszenz-Mikroskop gemacht.

3.7 Durchflusszytometrie

Pro Färbung wurden $2-3 \times 10^5$ Zellen eingesetzt. Dabei wurden M-MØP mit 200 U/mL mIFN γ über Nacht vorstimuliert. Die Zellen wurden mittels eiskaltem PBS vorsichtig aus dem 6-well abgeschabt und bei 4 °C und 300 x g für 5 min zentrifugiert. Nach Ernte der Zellen wurden diese zweimal mit 5 mL eiskaltem FACS-Puffer gewaschen. Die Zellen wurden in ein Polypolylen-Röhrchen mit Rundboden überführt und jeweils 100 μ L der Zellsuspension mittels 0,5 μ L CD16/32 für 10 min geblockt. Anschließend wurde für weitere 15 min mit dem entsprechenden Antikörper oder der jeweiligen Isotypkontrolle in der gleichen Verdünnung gefärbt.

Antikörper	Verdünnung
APC Anti-mouse CD45	1:200
APC Anti-mouse F4/80	1:100
FITC Rat Anti-mouse Ly-6G	1:100
FITC Hamster Anti-mouse CD11c	1:100
PE Rat Anti-mouse CD40	1:150
APC Anti-human CD40	1:20

Bei der Verwendung von Biotin gekoppeltem Antikörpern wurde nach der Inkubationszeit des Primärantikörpers dreimal mit FACS-Puffer gewaschen und für 15 min mit dem Sekundärantikörper gefärbt. Die Spezifität der Färbung wurde durch die korrespondierenden fluoreszenzmarkierten Isotypkontrollen überprüft. Vor der Vermessung im Durchflusszytometer (FACS Canto II, BD Bioscience) wurde ungebundener Sekundärantikörper durch zweimaliges Waschen mit FACS-Puffer entfernt.

3.8 Erstellung von Zelllysaten

Von 2×10^6 Zellen wurde das Medium abgezogen und mit 1 mL Waschpuffer (TBS, 1 mM Na_3VO_4) gewaschen. Die Zellen wurden in 1 mL Waschpuffer aufgenommen und mittels Zellschaber aus der Zellkulturschale abgelöst. Die Zellsuspension wurde in ein 15 ml Polypylenröhrchen überführt und bei 400 x g für 3 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das erhaltene Zellpellet in wenigen μL Rücklauf resuspendiert und in 90 μL 4x SDS-Probenpuffer aufgenommen. Durch den Überschuss an SDS und späteres Erhitzen der Probe wurden Sekundär- und Tertiärstruktur der Proteine zerstört. Der Zusatz von 2-ME dient zur Oxidation von Thiolgruppen. Bei der Untersuchung von Phosphoproteinen wurden dem Probenpuffer zusätzlich Phosphataseinhibitor-Cocktail-I und -II (1:50) zugesetzt. Um chromosomale DNA aufzubrechen, wurden die Proben zweimal für 1 min sonifiziert (Diagenode Bioruptor®). Anschließend wurden die Proben für 10 min auf 96 °C erhitzt, für 10 min bei 1000 x g zentrifugiert und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

3.9 Proteinbestimmungen

Die Proteinbestimmung der Zelllysate erfolgte mittels Pierce® BCA Protein Assay Kit (Thermo Scientific). Je 25 μL der Proben und des seriell verdünnten, im Kit enthaltenen Albumin Standards wurden in einer Mikrotiterplatte mit 200 μL der Arbeitslösung, ein Gemisch

aus Reagenz A und 2 % Reagenz B versetzt. Nach 30 min Inkubationszeit bei 37 °C konnte der Test photometrisch bei einer Wellenlänge von 540 nm ausgelesen werden.

3.10 SDS-PAGE und Immunblot

Die Proteine der gewonnenen Zelllysate wurden über Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) über ein elektrisches Feld ihrer Größe und Ladung nach aufgetrennt. Die Proben wurden hierfür auf ein Polyacrylamid Gel geladen und zwischen 90 und 130 Volt elektrophoretisch aufgetrennt. Je nach Proteingröße bestand das Polyacrylamid Gel aus einem Trenngel (374 mM Tris pH 8.8, 3,5 mM SDS, 0,1 % v/v APS, 0,1 % v/v TEMED) mit einem Acrylamidanteil von 12-15 % (v/v) und einem Sammelgel (123 mM Tris pH 6.8, 3,75 mM SDS, 6 % Acrylamid, 0,1 % APS, 0,1 % TEMED) in dessen Taschen die Proben geladen wurden. Nach Auftrennung der Proteine wurden diese durch ein Wet/Tank Blotting System (Peqlab) nach Herstellervorgaben auf eine PVDF-Membran (Peqlab, Porengröße 0,45 µM) für 1 h transferiert. Dies erfolgte bei einer Stromstärke von 1,5 mA pro cm² Gelfläche. Die transferierten Proteine wurden mittels spezifischer Antikörper nachgewiesen. Um eine unspezifische Bindung zu vermeiden wurde die Membran für 1 h in Blockpuffer inkubiert und kurz mit TBS-T gewaschen. Die Inkubation des spezifischen Primärantikörper gegen das nachzuweisende Protein erfolgte über Nacht. Die Antikörper wurden nach den Herstellervorgaben entsprechend verdünnt in 1 x Roti®-Block eingesetzt. Danach wurde die Membran dreimal für 5 min mit TBS-T gewaschen und für 1-2 h mit einem HRP (horseradish peroxidase) konjugiertem, gegen den Erstantikörper gerichteten Zweitantikörper inkubiert, der ebenfalls nach Herstellervorgaben in Roti®-Block verdünnt wurde. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit TBS-T wurde die Membran für 3 min mit einem Luminol-basiertem Substrat (1,4 mM Luminol, 0,6 mM p-Coumarinsäure, 10 % (v/v) DMSO, 0,0003 % (v/v) Wasserstoffperoxid in 0,1 M Tris pH 8.6) benetzt. Die Chemolumineszenz wurde über eine Charge Coupled Device Kamera (INTAS Chemilix Pro) detektiert. Die Bearbeitung der Bilder erfolgte über die Programme Image J und Adobe Illustrator CS6.

3.11 Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)

Die Bestimmung der sezernierten Zytokine nach Infektion bzw. Stimulation erfolgte über ELISA. Für die Bestimmung von mTNF und mIL-1β in den Infektionsexperimenten wurden Überstände von wt und p62^{-/-} BMDM untersucht. 1x10⁵ Zellen wurden mit *Listeria monocytogenes* EGDe mit einer MOI von 0,1 infiziert und die Überstände zu den jeweiligen Zeit-

punkten (2, 4, 6, 8 und 24 h nach Infektion) abgenommen, abzentrifugiert und für den ELISA eingesetzt.

Für die Bestimmung von mTNF, mIL-1 β und mIL-6 in M-MØP sowie hIL-6 und hIL-8 in 786-O wurden 3×10^5 Zellen im 6-well in 1 mL Medium stimuliert. Die Stimulation mit LPS erfolgte mit einer Konzentration von 1 μ g/mL. CD40L wurde in einer Konzentration von 100 ng/mL hinzugegeben. Durch einen Mediumwechsel vor Stimulation und einer unstimulierten Kontrollgruppe wurde der Einfluß einer endogenen Zytokinproduktion weitgehend reduziert. Nach 6 h wurde das Medium von den Zellen abgenommen und bis zur Analyse bei -20 °C gelagert. Die Überstände wurden dann entsprechend den Herstellervorgaben mit dem entsprechenden OptEIA ELISA Kit (BD) aufgearbeitet.

3.12 Transfektion mit siRNA-Oligonukleotiden

Der *knockdown* von p62 mittels siRNA in 786-O Nierenkarzinomzellen erfolgte mittels p62siRNA (Cell Signaling) sowie Kontroll-*non-target* (n.t.) siRNA (Qiagen) und des Transfektionsreagens Lipofectamine 2000 (Invitrogen). Durch die Transfektion bindet die siRNA an die komplementären einzelsträngigen Ribonukleinsäure-Moleküle und unterbindet dabei ihre Funktion. Dieser Effekt ist nicht persistent, da neue mRNA gebildet werden kann und diese Eigenschaft nicht mit der Zellteilung weitervererbt wird. Um unspezifische Effekte durch die Transfektion auszuschließen, erfolgte die Transfektion zusätzlich mit einer non-target (n.t.) Transfektionskontrolle. Diese n.t. siRNA wird über den gleichen Mechanismus von der Zelle aufgenommen bindet aber nicht an mRNA. Die Transfektionsprozedur richtete sich dabei nach Herstellerangaben. Dafür wurden 3×10^5 Zellen am Tag der Transfektion in 60x15 mm Schalen (BD Falcon, Tissue Culture Dish) ausgesät und für einige Stunden inkubiert. 5 nmol siRNA wurden in einem Ansatz mit 4,5 μ L Lipofectamin in 1 mL Opti-Mem Medium (Gibco, Life Technologies) für 20 min inkubiert und anschließend auf die Zellen getropft. Nach 6 h wurde das Medium abgezogen und durch RPMI1640-Medium, 10 % FCS ersetzt. Die Stimulationsversuche wurden 48 h nach Transfektion durchgeführt.

3.13 CD40L Produktion

Um CD40L zu produzieren wurden $7,5 \times 10^6$ HEK 293T Zellen auf 15 cm Schalen in DMEM, 10 % FCS ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium durch DMEM ersetzt. 30 μ g Fc-Flag-CD40L pCR3 (54) und 75 μ L PEI wurden für 20 min in 1 mL DMEM vorinkubiert und anschließend auf die Zellen getropft. Nach 5-6 h wurden das Medium abgenommen und

15 mL DMEM mit 1-5 % FCS zu den Zellen gegeben. Der Überstand wurde nach 48 h abgenommen und nochmals 15 mL hinzugefügt. Am nächsten Tag wurden die Überstände gepoolt und mittels einer „JumboSept“-Zentrifugations Vorrichtung (PALL) aufkonzentriert. Dafür wurde eine 10 K Membran verwendet und der Überstand bei 3000 x g für 35-50 min zentrifugiert. Der konzentrierte Überstand wurde steril-filtrierte und die ungefähre Konzentration wurde über Western Blot anhand eines Flag Standards bestimmt.

3.14 Immunpräzipitation

Um CD40, sein Ligand und anhängende Komplexe zu präzipitieren wurden konfluent gewachsene 786-O-Zellen in 15 cm Schalen für 60, 180, 360 min mit humanen Fc-Flag-CD40-Ligand inkubiert. Nach der Stimulation wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen und in 1 mL MCBL-Lysepuffer, versetzt mit Proteasom Inhibitor (Roche), mit einem Zellschaber abgelöst und für 60 min bei 4 °C lysiert. Danach wurde das Lysat bei 4 °C für 5 min bei 2700 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Röhrchen überführt und nochmals bei 4 °C für 20 min bei 14000 x g zentrifugiert. Anschließend wurde eine Proteinbestimmung mittel BCA-Test durchgeführt. Vom enthaltenen Lysat wurden 100 µL mit 30 µL 4x SDS Probenpuffer für 10 min bei 96 °C erhitzt. Das restliche Lysat wurde mit 40 µL Protein G Agarose (Roche) über Nacht bei 4 °C inkubiert. In die unstimulierte Probe wurde 100 ng Ligand hinzugegeben. Dies diente als Kontrolle der Immunpräzipitation, damit konnte eine generelle Bindung des Liganden an die Agarose-Beads geprüft werden. Die Agarose-Beads wurde am darauffolgenden Tag 5 x mit 1 mL MCBL-Lysepuffer gewaschen und jeweils durch Zentrifugation mit 1000 x g vom Überstand getrennt. Die nach letztem Waschschrift verbleibende Flüssigkeit wurde mittels einer 25 µL Hamilton Spritze entfernt. Die Proteine wurden mit 100 µL 1 x SDS Puffer durch 10 minütiges Erhitzen bei 96 °C von den Agarose Beads eluiert und zusammen mit den Lysaten bis zur Analyse bei -20 °C gelagert.

Um Komplexe um das Adapterprotein p62 zu identifizieren, wurden 2×10^7 der zu Makrophagen ausdifferenzierten ER-Hoxb8-Progenitorzellen (M-MØP) auf Sterilin Square plates (Sterilin Limited®) mit murinen CD40 Ligand (Immuno Tools), bzw. konfluent gewachsene 786-O in 15 cm Schalen mit humanen CD40 Ligand (Immuno Tools) stimuliert. Die Präzipitation von p62 erfolgte über Nacht mit 5 µg Anti-p62 Antikörper bei 4 °C inkubiert und anschließend wurde für 4 h 40 µL Protein Agarose A (Roche) hinzugegeben. Nach den Waschschriften und Elution der Proteine von den Agarose Beads konnten die Proben zur SDS-PAGE und Immunblot eingesetzt werden.

3.15 Statistik

Die Immunblot-Abbildungen sind repräsentativ und entsprechen (wenn nicht anders bezeichnet) mindestens 3 unabhängigen Experimenten. Diagramme wurden aus den Daten mehreren Experimenten (mindestens 3) erstellt, die Fehlerbalken stellen die mittlere Standardabweichung dar. Die statistische Signifikanz mit $p = 0,05$ (*) wurde über den Zweistichproben-t-Test ermittelt.

4. Ergebnisse:

4.1 p62-Defizienz beeinflusst nicht die Erregerlast von *Listeria monocytogenes*, die Sekretion von IL-1 β wird aber erhöht

Listerien werden wegen der Vielzahl an Evasionsstrategien oft als Modellmechanismus verwendet, um Wirt-Pathogen Interaktionen und fundamentale infektionsbiologische Prozesse aufzuschlüsseln. Mit Hilfe von Deletionsmutanten, bei denen einzelne Virulenzfaktoren ausgeschaltet sind, kann eine eindeutige Zuordnung des Erregers in ein intrazelluläres Kompartiment erfolgen. Um die Auswirkungen einer p62-Defizienz auf die Abwehr von intrazellulären Bakterien und das antimikrobielle Potential von p62 näher zu untersuchen wurden Infektionsversuche mit dem intrazellulären Erreger *Listeria monocytogenes* durchgeführt. Wenn p62 früh bakterielle Strukturen im Zytosol erkennt, stellt sich die Frage, ob die p62- abhängige Rekrutierung von antimikrobiellen Proteinen nur dem autophagosomalen Signalweg zur Verfügung steht, oder ob p62 über andere Signalwege, wie beispielsweise über TNFR1, das Infektionsgeschehen modulieren kann. Aus diesem Grund wurden die Erregerlast und die Sekretion von für die Infektion von bedeutsamen inflammatorischen Zytokinen in Knochenmarksmakrophagen (BMDM) untersucht. Makrophagen spielen bei der Abwehr von intrazellulären Erregern eine zentrale Rolle, da sie durch Phagozytose an der Eradikation von Bakterien beteiligt sind. In einer Infektionsstudie mit der Deletionsmutante *Listeria monocytogenes* Δ actA konnte die Rekrutierung von p62 zum Bakterium beobachtet werden. Zudem verringerte die Vorbehandlung der Zellen mit TNF nach einer Infektion die bakteriellen Belastung pro Zelle um etwa 28 % gegenüber unbehandelten Zellen (89). Ein direkter Zusammenhang einer Vorbehandlung von TNF und p62, oder der Einfluss einer p62-Defizienz wurde dabei nicht gezeigt. Daher wurde für die Untersuchung des antimikrobiellen Potentials von p62 unbehandelte, mit TNF vorstimulierte und mit rekombinanten murinen IFN γ vorstimulierte BMDM aus C57BL/6 Kontrollmäusen (wt) und p62^{-/-} C57BL/6 verwendet. Dabei dient die Vorstimulation mit IFN γ der Aktivierung der Makrophagen, wie es in vivo über NK Zellen moduliert wird (90). Die drei Gruppen wurden mit *Listeria monocytogenes* EGDe mit einer MOI von 0,1 für 30 min bei 37 °C infiziert (siehe auch Kapitel 3.4). Abbildung 9 zeigt die Wachstumskurven der unterschiedlichen Gruppen. Unbehandelte Zellen wiesen keinen Unterschied in den Wachstumskurven zwischen p62^{-/-} und wt-BMDM auf (Abb. 9A). Obwohl die TNFR1 Signaltransduktion von essentieller Bedeutung für die Abwehr einer Listerieninfektion ist (47), hatte eine Vorstimulation mit TNF und die damit zusätzliche Aktivierung dieses Signalweges ebenfalls in beiden Gruppen keinen Einfluss auf die Erregerlast (Abb. 9B), noch

unterschieden sich die Wachstumskurven von der Medium-Kontrolle (Abb. 9A). Die Gruppe, die mit IFN γ vorstimuliert war, wies im Vergleich zu den anderen beiden Gruppen eine deutlich reduzierte Erregerzahl auf. Dabei unterschieden sich Knochenmarksmakrophagen von p62-defizienten Mäusen jedoch nicht von der wt Kontrolle (Abb. 9C).

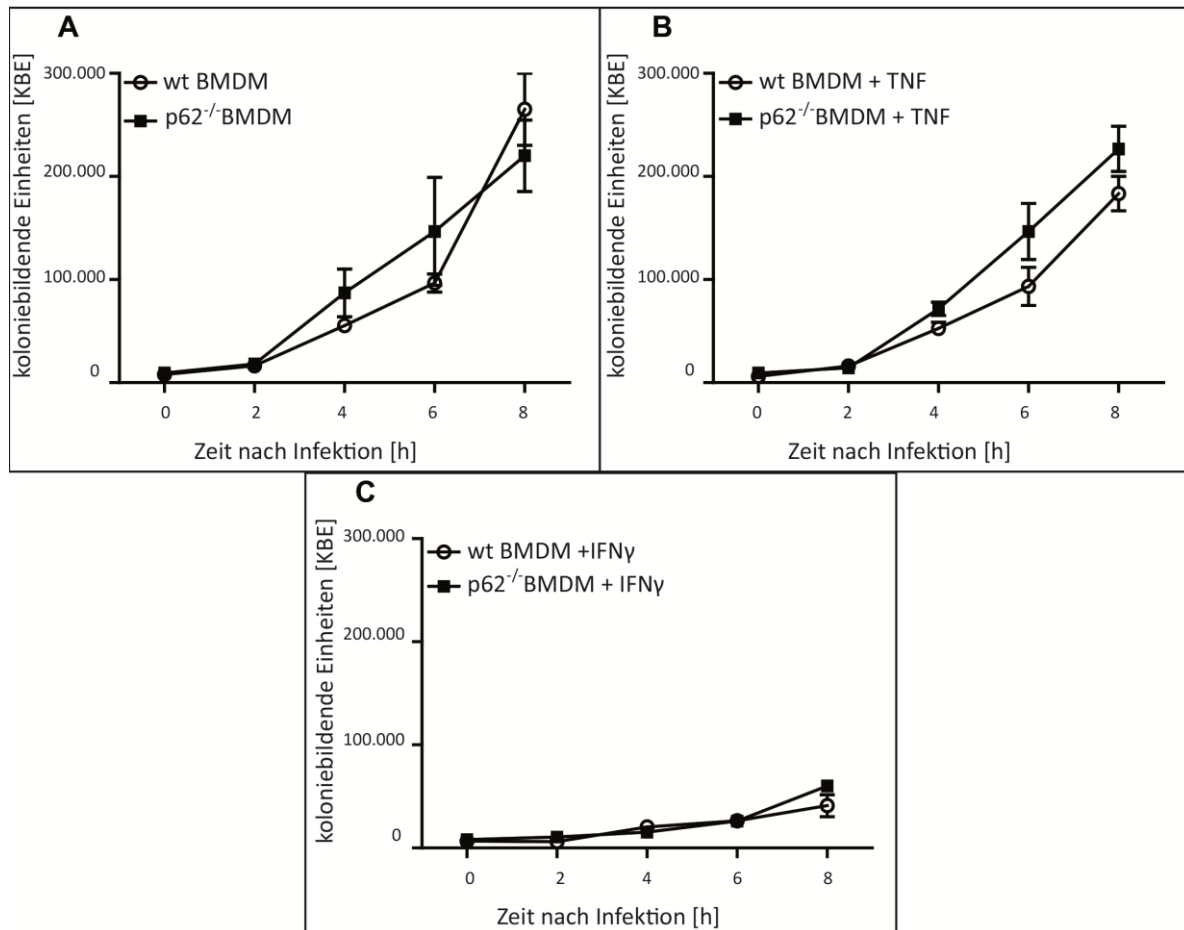


Abbildung 9: Wachstumskurven von *Listeria monocytogenes* in wt und p62^{-/-} BMDM nach unterschiedlicher Stimulation

1x10⁵ BMDM wurden im 96-well Format mit *Listeria monocytogenes* EGDe mit einer MOI = 0,1 für 30 min infiziert und extrazellulär verbliebene Bakterien mittels Gentamycin (50 μ g/mL) abgetötet. Die intrazelluläre Replikation wurde für insgesamt 8 Stunden verfolgt.

Da eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* mit der Aktivierung von verschiedenen Signalwegen einhergeht, die auf das Erkennen von bakteriellen Komponenten wie DNA oder Zellbestandteile zurückzuführen sind, wurde die Sekretion von verschiedenen Zytokinen untersucht, die mit diesen Signalwegen in Zusammenhang stehen. Diese Signalwege dienen vor allem der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, was in der Expression des Zielgens TNF und der Vorläuferform von IL-1 β (pro-IL-1 β) resultiert. Pro-IL-1 β wird durch aktive Caspase-1 gespalten, bevor es sezerniert werden kann (91). Aufgrund des mehrstufigen Prozesses, der Transkriptionsaktivierung und proteolytische Maturierung von IL-1 β sind Ände-

rungen in der Sekretion erst etwa 8 h bis 24 h nach der Infektion nachzuweisen. Eine TNF-abhängige Signaltransduktion und Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B erfolgte in relativ kurzer Zeit, wodurch eine Sekretion von TNF bereits nach wenigen Stunden detektiert werden konnte. Abbildung 10A zeigt die Zunahme von TNF im Verlauf der Infektion. Die freigesetzte Menge an TNF in p62^{-/-}-BMDM unterschied sich dabei nicht signifikant von wt-BMDM, jedoch war ein Trend zu einer höheren TNF-Sekretion in p62-defizienten Zellen erkennbar. Die Menge an IL-1 β wurde 24 h nach der Infektion bestimmt. Dabei wurde von p62-defizienten Zellen eine signifikant erhöhte Menge von IL-1 β im Vergleich zu den wt-Zellen sekretiert (Abb. 10B).

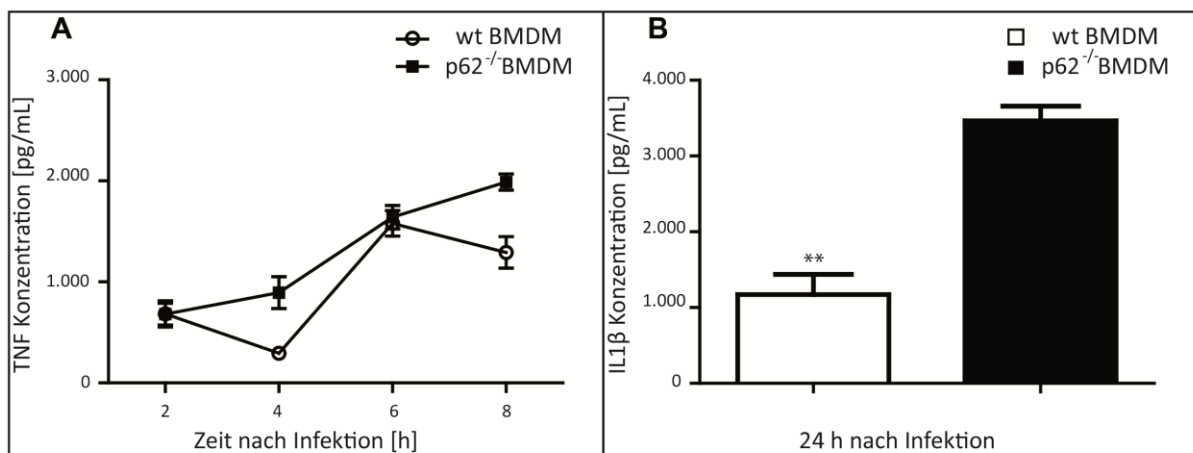


Abbildung 10: Zytokinsekretion von wt und p62^{-/-} BMDM nach Infektion mit *Listeria monocytogenes*
 1 \times 10⁵ BMDM wurden im 96-well Format mit *Listeria monocytogenes* EGDe mit einer MOI = 0,1 infiziert. (A) Überstände wurden nach 2, 4, 6 und 8 h abgenommen und der TNF-Gehalt mittels ELISA bestimmt. (B) Abnahme des Überstands nach 24 h und Bestimmung der IL-1 β Konzentration über ELISA.

Zusammenfassend konnte bei einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* EGDe bezüglich der Erregerlast kein Effekt durch p62 festgestellt werden. Die Vorbehandlung mit IFN γ , nicht jedoch mit TNF, förderte die Erregereradikation. Auffällig war, dass die Sekretion von IL-1 β in p62^{-/-}-BMDM im Vergleich zu wt-BMDM stark erhöht war. Dabei wurde in beiden Gruppen vergleichbar viel TNF sezerniert.

4.2 TNFR1- abhängige inflammatorische Signalwege in BMDMs werden nicht durch p62- Defizienz beeinflusst

Aufgrund der veränderten IL-1 β Sekretion in p62^{-/-}-BMDM wurde die Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen in diesem Zellmodell näher untersucht. Ein Einfluss von p62 auf TLR-abhängige Signaltransduktion über das Adapterprotein MyD88 wurde bereits beschrieben (77). Zudem besteht ein Zusammenhang zwischen der TNFR1-vermittelten NF- κ B

Aktivierung und p62 (12). Humanes TNF bindet in der Maus ausschließlich an TNFR1 (92). Um gezielt die TNFR1- abhängige Signaltransduktion zu beobachten, wurden wt-BMDM und p62^{-/-}-BMDM mit humanen TNF stimuliert und die inflammatorischen Signalwege NF-κB, p38, ERK und Akt untersucht. Abbildung 11 gibt eine Übersicht über die Proteinexpression der inflammatorischen Effektorkinasen p38, ERK und Akt sowie deren phosphorylierte und damit aktivierte Form. Eine Aktivierung von NF-κB kann indirekt über die Menge an phosphorylierten IκBα nachgewiesen werden. Das durch die Phosphorylierung für den proteasomalen Abbau markierte IκBα demaskiert die Kernlokalisationssequenz des NF-κB Dimers. Dabei konnte in der Aktivierung von NF-κB über die Surrogatemarkers IκBα und Phospho-IκBα keinen Unterschied zwischen p62^{-/-}-BMDM und wt-BMDM festgestellt werden. So findet in beiden Fällen eine Phosphorylierung nach 5 Minuten und eine zweite Phosphorylierung und Degradierung von IκBα nach 30 bis 60 Minuten statt. Des Weiteren hatte eine p62-Defizienz keine unterschiedliche Aktivierung der mitogenaktivierten Proteinkinasen p38 und ERK zur Folge, da beide Kinasen nach 5 bis 10 Minuten in beiden Gruppen ähnlich stark aktiviert wurden. Die Aktivierung von Akt wurde ebenfalls nicht durch p62-Deletion beeinflusst (Abb 11).

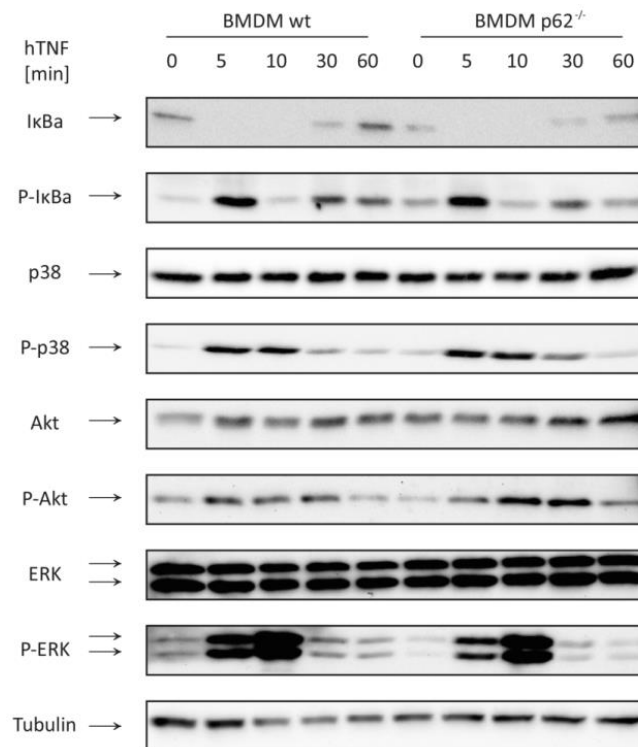


Abbildung 11: Die TNF induzierte inflammatorische Signaltransduktion wird in BMDMs nicht durch p62-Defizienz beeinflusst

2×10^6 BMDMs wurden im 6-well mit 100ng/mL hTNF für 5, 10, 30 und 60 Minuten stimuliert oder blieben unbehandelt. Die dargestellten Proteine und Phospho-Proteine wurden nach Zelllyse über Western Blot detektiert. Tubulin wurde als Ladekontrolle verwendet.

Zusammengenommen zeigen die bisherigen Ergebnisse, dass in diesem Zellmodell die proinflammatorische Signaltransduktion des TNF/TNFR1-Systems nicht durch p62 beeinflusst wird. Neben TNFR1 sind auch noch andere Rezeptorsysteme möglich, die während einer Infektion die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 β über NF- κ B Aktivierung vermitteln können. Eine Modulation von TLR/IL-1R Signalwegen durch die Bindung von p62 an TRAF6 ist bekannt (12). Auch das CD40 Rezeptorsystem bindet TRAF6 und moduliert, ähnlich der TLR/IL-1R-vermittelten Signaltransduktion, inflammatorische Signalwege. Dabei exprimieren Makrophagen konstitutiv CD40 und sind fähig nach Ligation von CD40L eine robuste inflammatorische Signalantwort, sowie eine Aktivierung von NF- κ B und p38 zu liefern. Dadurch dass CD40 seine Signaltransduktion über die Adapterproteine TRAF2 und TRAF6 moduliert, ist ein p62-abhängiger Effekt möglich. Um die Auswirkung einer p62-Defizienz in diesem Kontext zu untersuchen, wurde ein Zellmodell etabliert, das zu Makrophagen ausdifferenziert werden konnte. Dafür diente als Basis die p62^{-/-} und die p62 Δ ST-Maus, in der die TRAF6-Bindungsstelle von p62 deletiert wurde.

4.3 ER-Hoxb8 Makrophagen (M-MØP) sind morphologisch und funktionell ein valides Marophagensystem

Da Makrophagenzelllinien schwer zu transfizieren sind, ist die Möglichkeit der genetischen Deletion von p62 in bereits bestehenden Zelllinien begrenzt. Die Präparation von Knochenmarksmakrophagen ist ebenfalls durch die natürliche Variation von Individuen und durch die beschränkte Ausbeute limitiert. Aus diesem Grund wurde ein Makrophagen- Zellmodell etabliert. Dazu wurden Knochenmarkszellen aus der Maus isoliert und mittels Transfektion mit einem unter einem Östrogen-Promotor stehenden Hoxb8 Gen immortalisiert. Diese Methode hat den Vorteil, dass die Zellen durch die Expression des Hoxb8 Gens im Vorläuferstatus verbleiben, sich dauerhaft teilen und somit eine unlimitierte Kapazität von Makrophagenprogenitoren liefern (88). Diese Progenitorzellen (MØP) konnten durch das Entfernen von Östrogen aus dem Medium und mittels der Zugabe von M-CSF zu Makrophagen (M-MØP) ausdifferenziert werden. Um die erstellten Makrophagen zu charakterisieren, wurden sie anhand ihrer Oberflächenantigene morphologisch untersucht und auf ihre Funktionalität getestet. Diese Ergebnisse wurden anschließend mit Knochenmarksmakrophagen verglichen.

Während der Transformation unter M-CSF veränderten sich die Vorläuferzellen mit ihrer rundlichen Form und großem Nukleus zu typischen adhärenenten Makrophagen-ähnlichen Zellen mit granularer und gestreckter Struktur (Abb. 12). Diese Strukturen konnten bereits nach drei Tagen vereinzelt beobachtet werden. Am fünften Tag war der Großteil dieser Zellen zu Makrophagen ausdifferenziert und zeigte bei weiterer Kultur eine starke Abnahme der Viabilität.

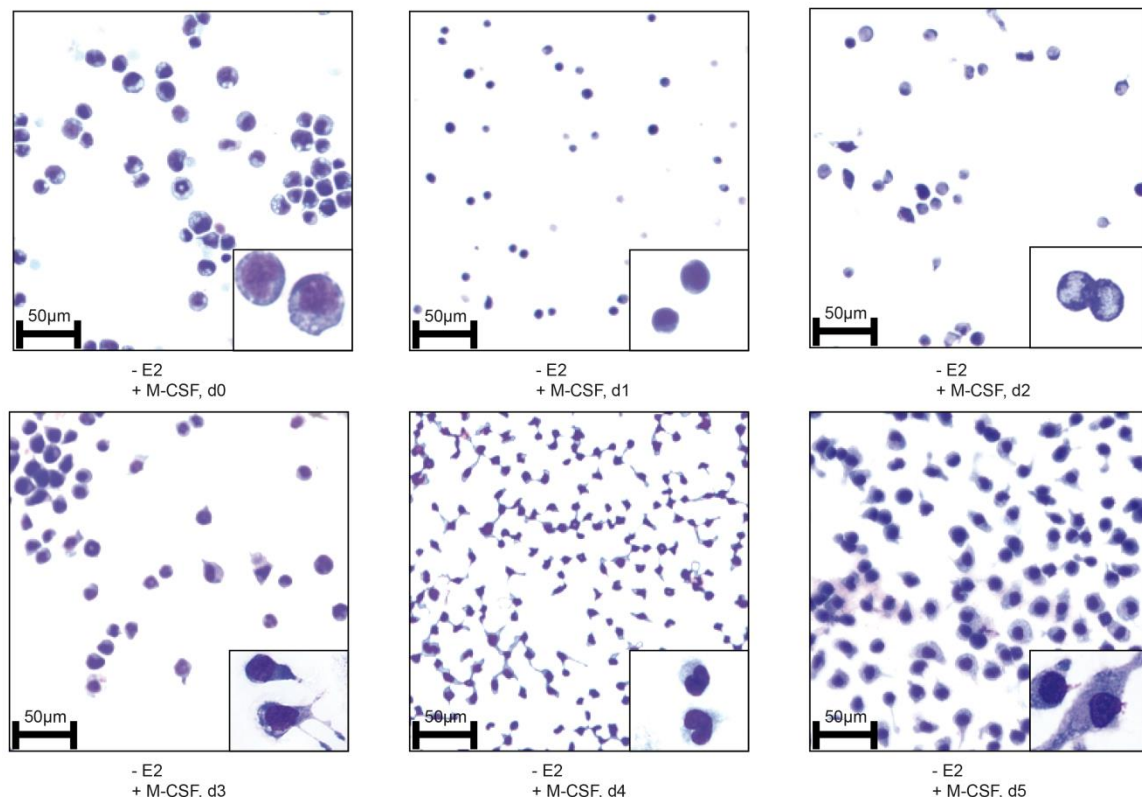


Abbildung 12: Diff Quick Färbung der MØP während ihrer Ausdifferenzierung zu M-MØP

2x10 Zellen wurden auf *Cover-Slips* ausgesät und mit M-CSF ausdifferenziert. Dann wurden die Zellen mit einem Triphenylmethanfarbstoff, Xanthenfarbstoff und Thiazinfarbstoff gefärbt, fixiert und mikroskopiert. (Übersicht 10x Vergrößerung, Insert 100x Vergrößerung)

Um die Zellen zu charakterisieren, wurden verschiedene typische Oberflächenantigene von Makrophagen gewählt (93). Die Oberflächenrezeptoren von MØPs und durch $\text{IFN}\gamma$ aktivierte M-MØPs wurden über FACS-Analyse identifiziert und direkt mit aus der Maus generierten, $\text{IFN}\gamma$ vorstimulierten Knochenmarksmakrophagen verglichen (Abb. 13). Für die Färbung wurde CD45, ein Marker für Lymphozyten, der Makrophagenmarker F4/80 und CD40 gewählt. Der Rezeptor CD11b findet sich ebenfalls auf Makrophagen und vermittelt die Phagozytose. Als Negativkontrolle wurde Lys6G, ein typischer Rezeptor von murinen Granulozyten eingesetzt. Während die undifferenzierten Progenitorzellen (MØP) als Vorläuferzellen der myeloiden Reihe lediglich CD45 exprimierten, veränderte sich die Zusammensetzung der Oberflächenantigene während der Differenzierung. Am fünften Tag exprimierten die Zellen CD45, F4/80, CD11b und CD40. Die Negativkontrolle Lys6G wurde weder auf den Vorläuferzellen noch auf den ausdifferenzierten M-MØP exprimiert (Abb. 13A). Die Expressionslevel der untersuchten Rezeptoren waren dabei, gemessen an der MFI, vergleichbar mit der Expression in Knochenmarksmakrophagen (Abb. 13B).

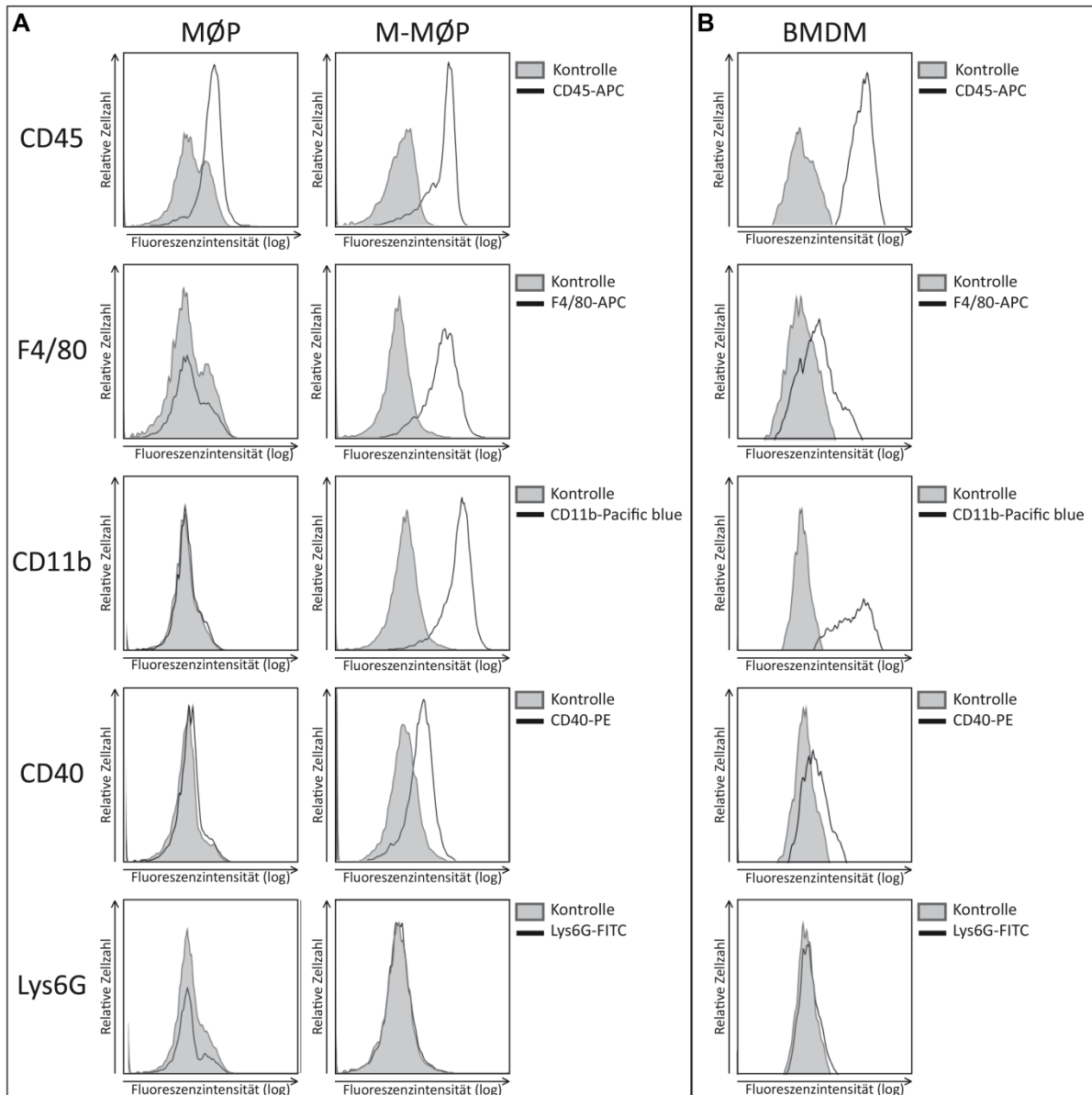


Abbildung 13: Oberflächenexpression von Makrophagenmarker in Progenitorzellen (MØP), ausdifferenzierten, IFN γ aktivierten Makrophagen (M-MØP) und Knochenmarksmakrophagen (BMDM)

Pro Gruppe wurden 2×10^5 Zellen mit fluorophorkonjugierten Antikörper gegen CD45, F4/80, CD11b, CD40 und Lys6G bzw. mit der dazugehörigen Isotypkontrolle gefärbt und die Fluoreszenz im Durchflusszytometer gemessen.

In der Expression von Oberflächenantigenen verhielt es sich analog zu den mikroskopischen Beobachtungen. Nach fünf Tagen entsprachen die ausdifferenzierten Zellen sowohl morphologisch als auch in der Expression der Oberflächenrezeptoren Makrophagen.

Um die Zellen auf ihre Funktionalität zu untersuchen, wurden M-MØP mit LPS stimuliert um TLR4-abhängige Signalwege zu induzieren. Anschließend wurde die Sekretion von TNF und IL-1 β untersucht. Während der Stimulationsreihe mit LPS konnten keine Unterschiede bei der TNF-Sekretion zwischen p62 $^{-/-}$ -M-MØP und wt-M-MØP festgestellt werden. Überras-

schenderweise ergab sich eine drastische Reduzierung der IL-1 β Antwort in p62^{-/-}-M-MØP 24 h nach LPS Stimulation (Abb. 14).

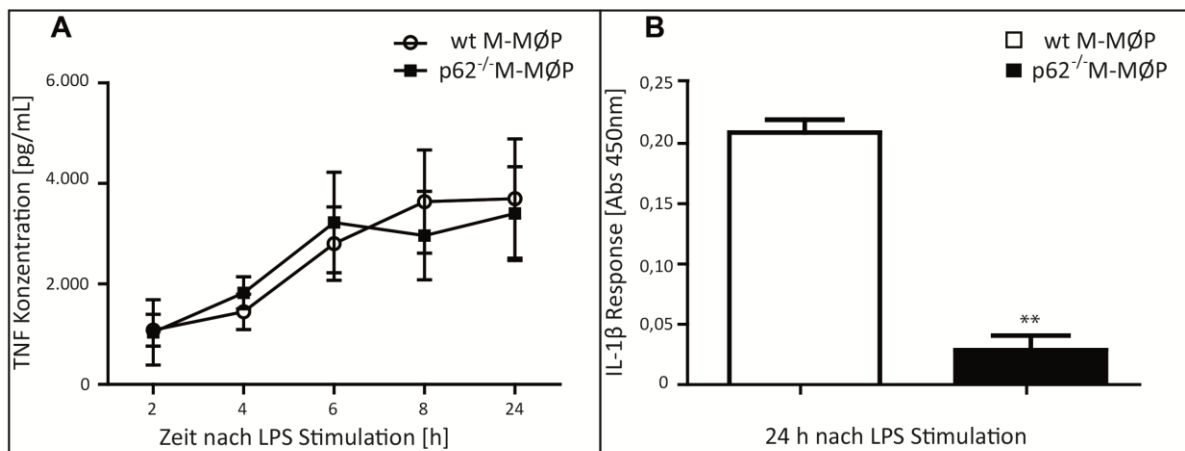


Abbildung 14: LPS induzierte IL-1 β Sekretion ist, bei unveränderter TNF Sekretion, in p62-defizienten M-MØP stark vermindert

3X10⁵ M-MØP wurden im 96-well ausgesät und mit 1 μ g/ μ L LPS stimuliert. (A) Die Überstände wurden nach 2,4,6,8 bzw. 24 h abgenommen und der TNF-Gehalt über ELISA bestimmt. (B) Der Überstand 24 h nach Stimulation wurde auf den Gehalt an IL-1 β untersucht.

Generell konnte anhand der Sekretion der inflammatorischen Zytokine TNF und IL-1 β gezeigt werden, dass die M-MØP zu einer funktionellen Antwort nach LPS Stimulation fähig sind. Der Umstand, dass p62^{-/-}-M-MØP im Gegensatz zu einer Listerieninfektion, bei LPS Stimulation zu einer stark verringerte IL-1 β Sekretion neigen, ist durch die Komplexität einer Infektion erklärbar. Bei einer Infektion spielen mehrere Faktoren, allein die zahlreichen Evasionstrategien von *Listeria monocytogenes* EGDe und die dazugehörige Immunantwort der Zelle, eine Rolle. Daher ist bei einer Infektion ein Rückschluss auf einen einzigen Signalweg nur bedingt möglich. Die enorme IL-1 β Sekretion in p62^{-/-}-BMDMs während einer Infektion könnte durch eine verstärkte Inflammasomaktivierung resultieren, deren Reprimierung in p62-defizienten Zellen gestört ist. Zusätzlich werden bei einer Listerieninfektion überwiegend Signalwege wie TLR2 und TLR5 induziert (Hayashi et al., 2001), während LPS an TLR4 bindet, was ebenfalls einen Unterschied ausmachen könnte. Die stark verringerte IL-1 β Sekretion in p62^{-/-}-M-MØP stützte allerdings die Hypothese, dass p62 in TRAF6 bindenden Rezeptorkomplexen für eine effektive NF- κ B Aktivierung benötigt werden.

Da das etablierte Makrophagenmodell M-MØP auf die funktionelle TNFR1- abhängigen Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen untersucht und mit BMDM verglichen werden sollte, erfolgte die Analyse der NF- κ B- und MAPK-Aktivierung sowie des PI3K/Akt Signal-

wegs nach Stimulation mit humanen TNF. Die aus immortalisierten Vorläuferzellen generierten M-MØP wiesen dabei in allen untersuchten Signalwegen eine zu BMDM analoge Aktivierung auf und zeigten dabei ebenfalls keinen Unterschied zwischen aus wt-M-MØP und p62^{-/-}-M-MØPs. So wurde IκBα nach 5 min und 60 min phosphoryliert. Eine Aktivierung der MAPK p38 und ERK erfolgte nach 5 bis 10 Minuten und Phospho-Akt konnte vermehrt in einem Zeitraum zwischen 5 und 30 Minuten detektiert werden (Abb. 15).

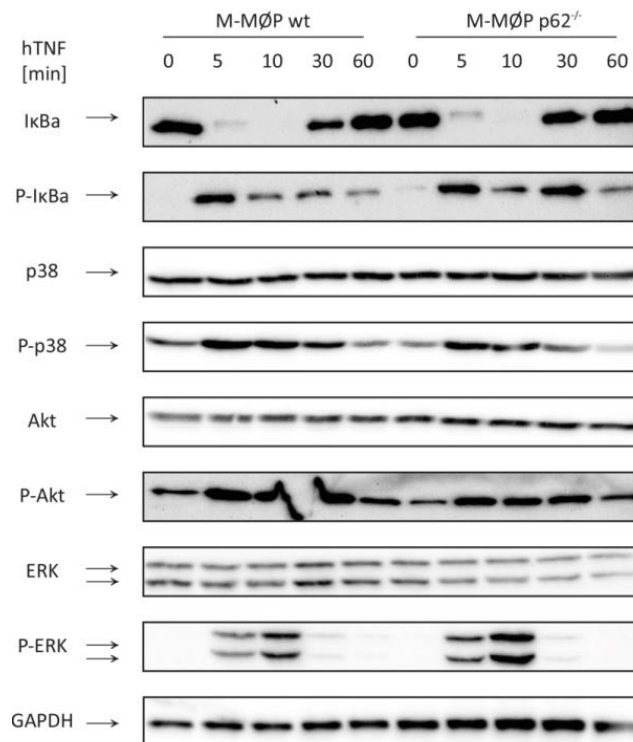


Abbildung 15: hTNF induzierte Signalwege in wt und p62^{-/-} M-MØPs

MØP (2x10⁶ Zellen) wurden mittels M-CSF im 6-well-Format ausdifferenziert und einen Tag vor Stimulation mit mIFNγ (200 U/mL) behandelt. Die Zellen wurden mit 100 ng/mL hTNF für 5, 60 und 360 Minuten stimuliert oder blieben unbehandelt (0). Nach Zelllyse wurden die angegebenen Proteine über Western Blot detektiert.

Zusammenfassend wurde gezeigt, dass M-MØP sowohl in ihrer Morphologie und in ihrer Rezeptorexpression primären murinen Makrophagen entsprechen. Diese weisen in der Aktivierung der untersuchten TNF/TNFR1-assoziierten Signalwegen ebenfalls keine Unterschiede zwischen wt- und p62^{-/-}-Zellen auf, was den Ergebnissen in Knochenmarksmakrophagen entspricht. Eine Aktivierung des TLR4-abhängigen Signalwegs durch LPS hatte dabei keinen Einfluss auf die TNF-Sekretion von p62^{-/-}-M-MØP im Vergleich zu wt-M-MØP. Allerdings war die IL-1β Antwort in p62^{-/-}-M-MØP drastisch reduziert, was für eine Effektor-Rolle von p62 in der TRAF6-abhängigen Signaltransduktion sprechen könnte.

4.4 Verringerungen der NF- κ B Aktivierung in p62 $_{\Delta$ ST-M-MØPs nach CD40L-Stimulation

Da die verminderte IL-1 β Sekretion in p62 $^{-/-}$ -M-MØP nach LPS Stimulation auf einen Effekt in der TRAF6-abhängigen TLR4-Signaltransduktion hindeutet, wurde die Rolle von p62 in weiteren proinflammatorischen, TRAF6-abhängigen Rezeptor-Ligand-Systemen wie CD40/CD40L untersucht. Zu diesem Zeitpunkt wurden p62 $^{-/-}$ - und wt-Mäuse auf ihren genetischen Hintergrund untersucht, da vermehrt Unterschiede im Phänotyp der jeweiligen wt Stämme C57BL/6J und C57BL/6N aufgetreten waren. Die Untersuchung ergab eine maximale Durchmischung beider Unterstämme in den in dieser Arbeit verwendeten p62 $^{-/-}$ (44 % C57BL/6N) und wt- (45 % C57BL/6N) Mäusen. Aus diesem Grund wurden aus der p62 $_{\Delta$ ST (83% C57BL/6N) Maus und der Wurfgeschwisterkontrolle (mit dem damit ähnlichem genetischen Hintergrund) neue MØPs generiert. Die Bezeichnung Δ ST bezieht sich auf die Deletion der Aminosäuren 69-251 in p62 und inkludiert dabei die TRAF6 Bindungsstelle. Diese Mutation hat den Vorteil, dass selektiv Funktionen von p62 die an TRAF6 gekoppelt sind, untersucht werden können. Andere Funktionen des Proteins p62 bleiben dabei unbeeinflusst. Die generierten p62 $_{\Delta$ ST-MØP wurden zu Makrophagen ausdifferenziert und entsprachen dabei ebenfalls in Morphologie und Rezeptorexpression murinen Knochenmarksmakrophagen. Die trunkierte Form des Proteins in p62 $_{\Delta$ ST-M-MØP kann, im Zell-Lysat als Bande mit geringerem Molekulargewicht (etwa 43 kDa), als das Protein aus wt-M-MØP detektiert werden (Abb 16). Dieses Molekulargewicht stimmt dabei mit der erwarteten Erniedrigung der Proteingröße der Deletionsmutante p62 $_{\Delta$ ST überein.

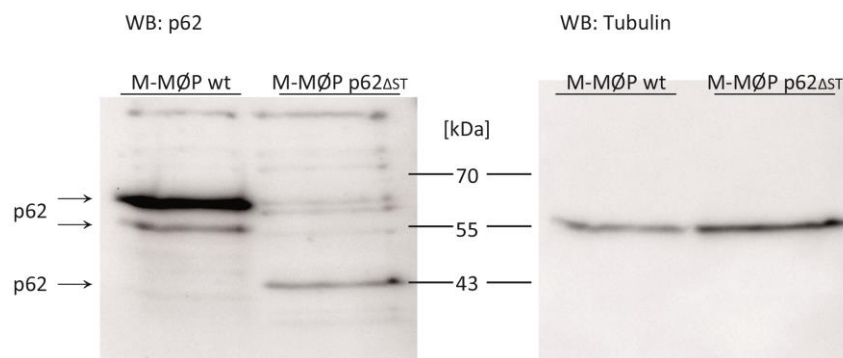


Abbildung 16: Proteinexpression von p62 in p62 $_{\Delta$ ST-M-MØP und Wurfgeschwister Kontrolle M-MØP
MØP (2x10⁶ Zellen) wurden mittels M-CSF im 6-well-Format ausdifferenziert und über Nacht mit IFN γ vorstimuliert. Nach MCBL-Zelllyse wurden p62 und die Ladekontrolle Tubulin über Western Blot detektiert

Arbeiten an dem TRAF6-bindenden TNF-Rezeptorfamilienmitglied RANK konnten zeigen, dass p62-Defizienz zu einem geschwächten NF- κ B Langzeitsignal in BMDM führt (78). Aus

diesem Grund wurden bei den geplanten CD40-Stimulationsexperimenten auch spätere Zeitpunkte berücksichtigt. Dabei konnte bei CD40-Stimulation eine verminderte NF- κ B Aktivierung, anhand der stark reduzierten Phosphorylierungsbanden von I κ B α nach 60 Minuten und 6 h nach Stimulation in p62 $_{\Delta$ ST M-MØPs detektiert werden (Abb. 17A). Ein Effekt durch eine autokrine Aktivierung über einen anderen Signalweg, wie TNFR1, kann dabei weitgehend ausgeschlossen werden, da die TNF- abhängige NF- κ B Aktivierung in p62 $_{\Delta$ ST-M-MØP völlig identisch zu wt-M-MØP verläuft (Abb. 17B). In anderen, CD40L- induzierten inflammatorischen Signalwegen konnte kein Effekt durch die p62 Deletionsmutante beobachtet werden. So wies die Aktivierung von p38 in p62 $_{\Delta$ ST M-MØP keinen Unterschied zu den wt-Zellen auf und auch in der Aktivierung von Akt konnte in beiden Zellen keine Divergenz festgestellt werden. Die Aktivierung des alternativen NF- κ B Signalweges, ausgelöst durch die Rekrutierung von TRAF2 zum CD40 Rezeptor mit nachfolgender Stabilisierung von NIK, kann durch die Prozession der p100 Untereinheit zur p52 Untereinheit detektiert werden. Dieser TRAF6-unabhängige Signalweg wird ebenfalls nicht durch p62 $_{\Delta$ ST-M-MØP beeinflusst (Abb. 17A). Als zusätzliche Kontrolle wurde die TNFR1-abhängige Signaltransduktion untersucht. Zum einen sollte eine Vergleichbarkeit der Zelllinien p62 $^{-/-}$ BMDM, p62 $^{-/-}$ M-MØP und p62 $_{\Delta$ ST M-MØP geschaffen werden, und damit ein möglicher Einfluss des unterschiedlichen genetischen Hintergrund weitgehend minimiert werden. Zum anderen sollte die Spezifität der p62-TRAF6 Interaktion über die Beeinflussung von inflammatorischen Signalwegen durch die Stimulation des TRAF6 unabhängigen TNF/TNFR1-Systems überprüft werden (Abb. 17B). Die Aktivierung von p38 und Akt sowie die Phosphorylierung von I κ B α wurden dabei nicht durch p62-Defizienz beeinträchtigt. Diese Beobachtungen passen zu der Hypothese, dass TRAF6 abhängige Signalsysteme über p62 moduliert werden, da die TNFR1-abhängige Signaltransduktion unabhängig von TRAF6 ist.

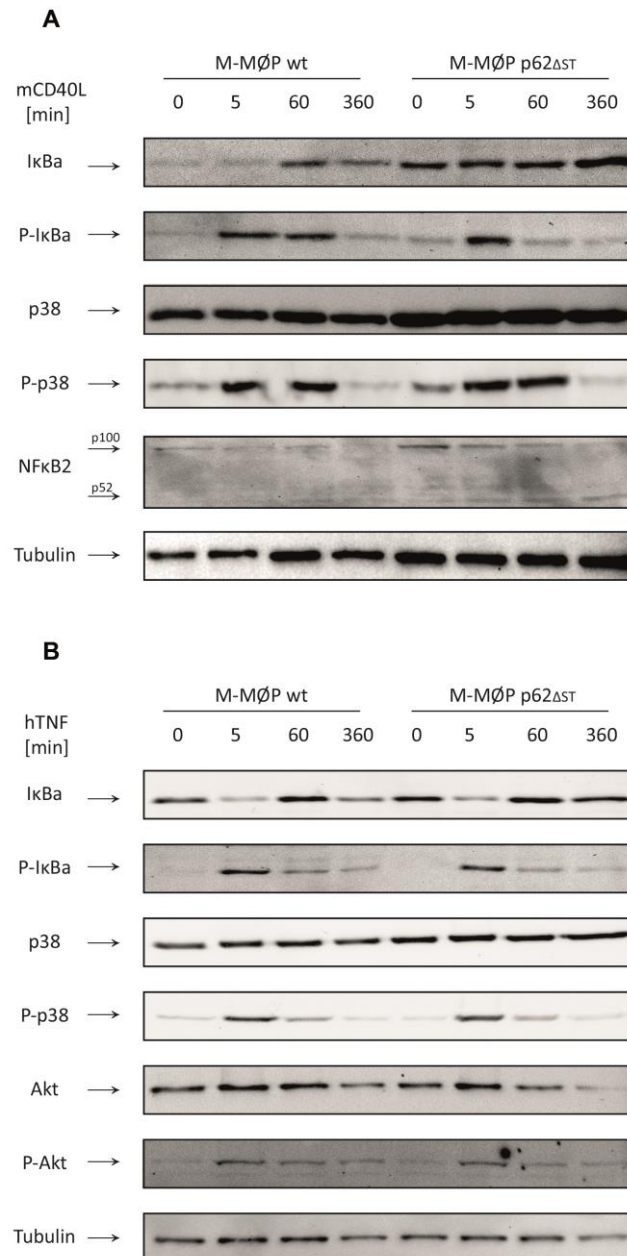


Abbildung 17: CD40L induzierte Signaltransduktion in wt und p62 Δ ST-M-MØPs

2x10⁶ Zellen wurden im 6-well ausgesät und mittels M-CSF und Östradiolentzug für 5 Tage ausdifferenziert und 24 h vor Stimulation mit mIFN γ (200 U/mL) behandelt. Die Zellen wurden mit 100 ng/mL mCD40L(A) oder 100ng/mL hTNF (B) für 5, 60 und 360 Minuten stimuliert oder blieben unbehandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und die angegeben Proteine über Western Blot detektiert. In beiden Stimulationsexperimenten diente Tubulin als Ladekontrolle.

Da eine verringerten Phosphorylierung des Surrogatmarkers I κ B α nach CD40L Stimulation für eine verminderte NF- κ B Aktivierung spricht, wurden die Überstände der stimulierten Zellen, auf die Zytokin-Zusammensetzung von NF- κ B Zielgenen untersucht. Dabei wurden die Zytokine TNF und IL-6 nach 5 bzw. 6 h im abgenommen Zellkulturmedium untersucht und gegen eine unstimulierte Probe normiert. Die Sekretion von TNF war vergleichbar in beiden

Gruppen (Abb. 18A). Allerdings erhöhte sich die Sekretion von IL-6 in den wt-M-MØP um das etwa 3-fache, gegenüber der unstimulierten Probe, während dieser Wert in p62 Δ ST-Makrophagen nur um das 1,5-fache anstieg (Abb. 18B).

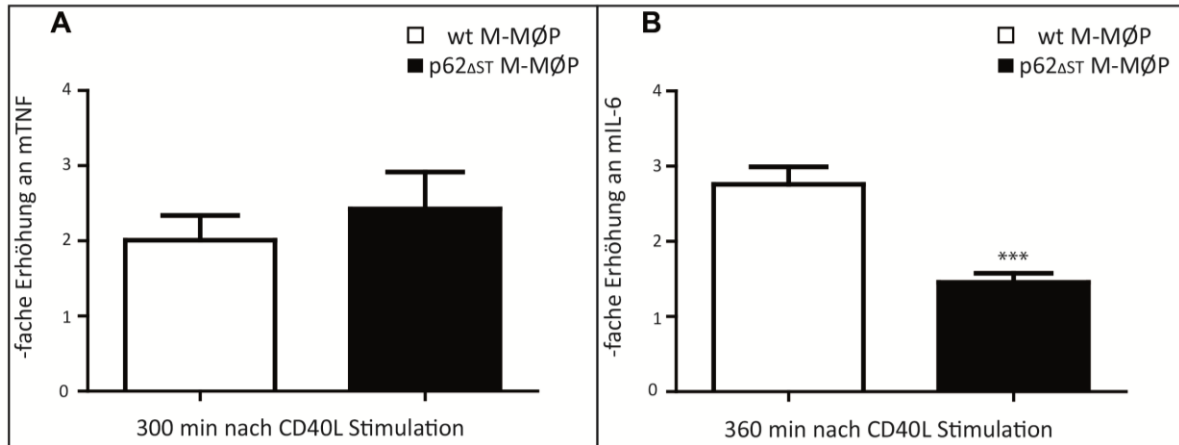


Abbildung 18: mTNF- und mIL-6- Sekretion nach CD40 Stimulation in wt und p62 Δ STM-MØPs
 3×10^5 M-MØP wurden im 6-well Format mit CD40L (100ng/mL) stimuliert. Die Erhöhungsrates der Zytokinsekretion wurde über eine unstimulierte Probe ermittelt. (A) Überstände wurden nach 5 h abgenommen und der TNF-Gehalt mittels ELISA bestimmt. (B) IL-6 Sekretion von wt M-MØPs und p62 Δ ST M-MØPs 6 h nach CD40L Stimulation.

So wurde erstmals gezeigt, dass p62 ein Intermediat der TRAF6-abhängigen CD40/CD40L Signaltransduktion sein kann. Dies äußert sich in der Phosphorylierung von I κ B α und „downstream“ der NF- κ B Signalkette durch die Reduktion der Sekretion des Zielgens IL-6. Zusätzlich kann diese Interaktion durch die Verwendung von p62 Δ ST-M-MØP direkt auf die Bindungsstelle zwischen p62 und TRAF6 zurückgeführt werden und nicht auf eine andere Funktion des pleiotropen Proteins p62.

4.5 Bildung eines TRAF6-p62-abhängigen Komplex nach CD40 Stimulation

Eine direkte Interaktion von p62 mit TRAF6 ist aus dem TLR/IL-1R System bekannt (12). Daher galt es zu überprüfen ob p62 über TRAF6 auch direkt an der CD40 Signalachse beteiligt ist. Eine Interaktion von p62 mit TRAF6 nach CD40 Stimulation wurde bislang noch nicht untersucht. Aus diesem Grund wurde aus dem Lysat der CD40L stimulierten M-MØP eine p62 Antikörper-Immunpräzipitation durchgeführt. So konnte die Anreicherung von p62 in der Immunpräzipitation (IP) im Vergleich zum Gesamt-Zelllysate (L) eine erfolgreiche Immunpräzipitation von p62 bestätigen (Abb. 19). Zudem konnte während der CD40L-Stimulation durch diese Methode an p62 ebenfalls TRAF6 detektiert werden. TRAF2 findet sich dabei, im Einklang mit der Hypothese, dass es unbeteiligt an der p62-abhängigen Sig-

nalmodulation ist, nicht am p62-Komplex. Durch die Präzipitation von p62 über Anti-p62 Antikörper sind im Immunblot durch die Benutzung eines gegen das IgG-gerichteten Sekundärantikörper immer die leichte und schwere IgG-Kette des verwendeten p62 Antikörper zu sehen.

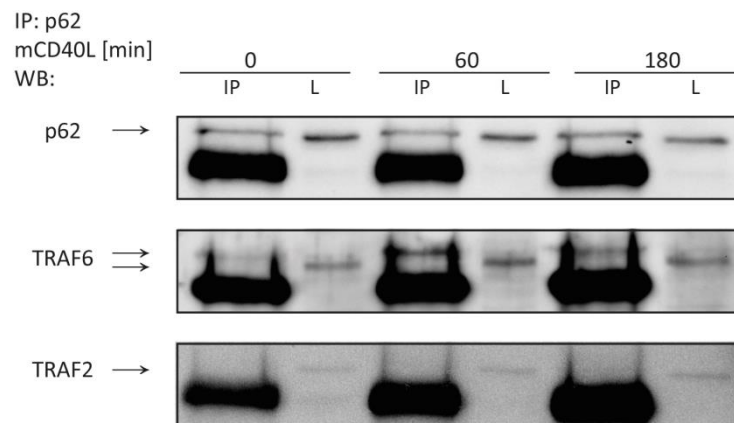


Abbildung 19: Bildung eines durch CD40 Stimulation- abhängigen p62-TRAF6 Komplex in wt M-MØP
 2×10^7 wt-M-MØP wurden auf Sterilin Square plates mit M-CSF für 5 Tage ausdifferenziert. Nach Vorstimulation mit $\text{IFN}\gamma$ (über Nacht) wurde mit 100 ng/mL mCD40L für 60, 180 min stimuliert. Anschließend wurden die Zellen in TBS abgeschabt und in 400 μL MCBL-Lysepuffer aufgenommen und für eine Stunde lysiert. Das Lysat wurde über Nacht mit Anti-p62 Antikörper inkubiert und anschließend für 4 h mit Protein A Agarose präzipitiert. Die Proteine p62, TRAF6 und TRAF2 wurden über Immunblot detektiert. Das Experiment wurde zweimal durchgeführt.

So konnte eine Bindung von p62 an TRAF6 zum ersten Mal in Abhängigkeit einer CD40 Stimulation nachgewiesen werden. Dieser Befund liefert eine mögliche Erklärung der vorausgegangenen Beobachtungen der verringerten NF- κB Aktivierung (über den Surrogatmarker $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ und die Sekretion des NF- κB Zielgens IL-6) in CD40L stimulierten p62 $_{\Delta\text{ST}}$ -M-MØPs. Die TRAF6-p62 Interaktion scheint daher wichtig für eine CD40-vermittelte NF- κB Aktivierung zu sein.

4.6 TRAF6 und p62 sind Komponenten des CD40 Rezeptorkomplex in 786-O

Um zelltypspezifische Phänomene auszuschließen wurde die Nierenkarzinomzelllinie 786-O ebenfalls die Komponenten des CD40 Rezeptorkomplex untersucht. Zuerst wurden 786-O auf ihre CD40 Rezeptorexpression überprüft. Dabei konnte gezeigt werden, dass 786-O CD40 exprimieren (Abb. 20).

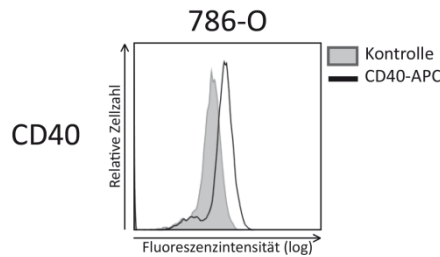


Abbildung 20: CD40 Expression in 786-O

2×10^5 786-O Zellen wurden mit APC- gekoppelten Antikörper gegen CD40 bzw. mit der dazugehörigen Isotypkontrolle gefärbt und die Fluoreszenz wurde im Durchflusszytometer gemessen.

Mittels Immunpräzipitation des CD40/CD40L-Komplex sollte überprüft werden, ob p62 während der CD40 Stimulation mit dem Rezeptorkomplex interagiert, oder ob die Beobachtungen im M-MØP System zellspezifisch sind. Die Präzipitationseffizienz ergibt sich über die Detektion von CD40. Dabei konnten die Proteine p62, TRAF6 sowie TRAF2 am CD40/CD40L-System identifiziert werden. Auffällig war, dass die CD40-Banden im Lysat (L) bei scheinbar niedrigerem Molekulargewicht als die Bande im Präzipitat (IP) über die Gelelektrophorese aufgetrennt wurden. Dieses Phänomen wurde bereits von Salzmann et al., beschrieben, der ebenfalls CD40 in 786-O präzipitiert hatte. Demzufolge handelt es sich nicht um unvollständig denaturiertes oder glykolisiertes Protein, sondern wahrscheinlich um eine ubiquitinylierte Form des Rezeptors (94) (Abb. 21).

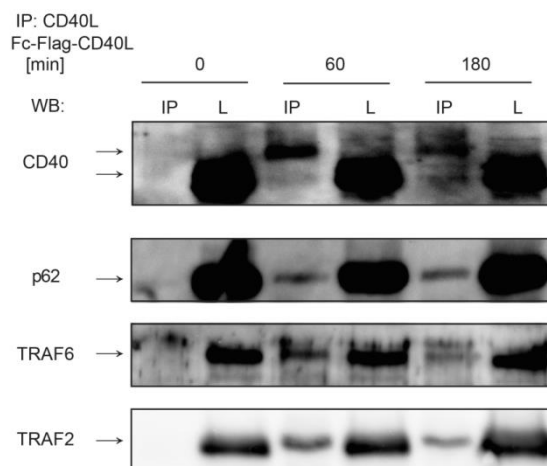


Abbildung 21: Anreicherung von TRAF2, TRAF6 und p62 am CD40 Rezeptorkomplex in 786-O

2×10^7 786-O wurden mit 100 ng/mL humanen Fc-Flag-CD40L für 60 min und 180 min stimuliert oder blieben unbehandelt. Die Zellen wurden in TBS abgeschabt, in 1 mL MCBL-Lysepuffer aufgenommen und für eine Stunde lysiert. Das Lysat wurde mit 50 μ L Protein G Agarose über Nacht präzipitiert. Die Proteine p62, TRAF6 und TRAF2 wurden über Western-Blot detektiert.

Zudem konnte gezeigt werden, dass bei einer Immunpräzipitation nach p62 ebenfalls Komponenten des CD40-Signalkomplexes zu finden sind. Während durch CD40L Stimulation eine

zeitabhängige Interaktion zwischen p62 und TRAF6 gezeigt werden konnte, findet sich kein TRAF2 an p62. Die TRAF6-Bande wird in der Gelelektrophorese als Protein mit höherem Molekulargewicht im Präzipitat (IP) aufgetrennt. Dies könnte ebenfalls durch eine Ubiquitinierung verursacht werden, zumal p62 die TRAF6-abhängige Autoubiquitinierung fördert (Abb. 22A). Da in der Literatur aPKC ζ als Interaktionspartner von p62 in der TRAF6-abhängigen Signaltransduktion genannt wird (68), wurde das Präzipitat auch auf eine Anreicherung von aPKC ζ untersucht. Dabei konnte aPKC ζ bereits in unstimulierten Zellen an p62 assoziiert nachgewiesen werden, reicherte sich jedoch im Laufe der Stimulation nicht an, wie es bei TRAF6 zu beobachten war (Abb. 22A). Als Kontrolllexperiment wurde p62 nach TNF Stimulation präzipitiert. Dabei konnte keine Assoziation von p62 zu TRAF6 detektiert werden. Demgegenüber wird aber die Bindung zu aPKC ζ im Lauf der Zeit angereichert (Abb. 22B).

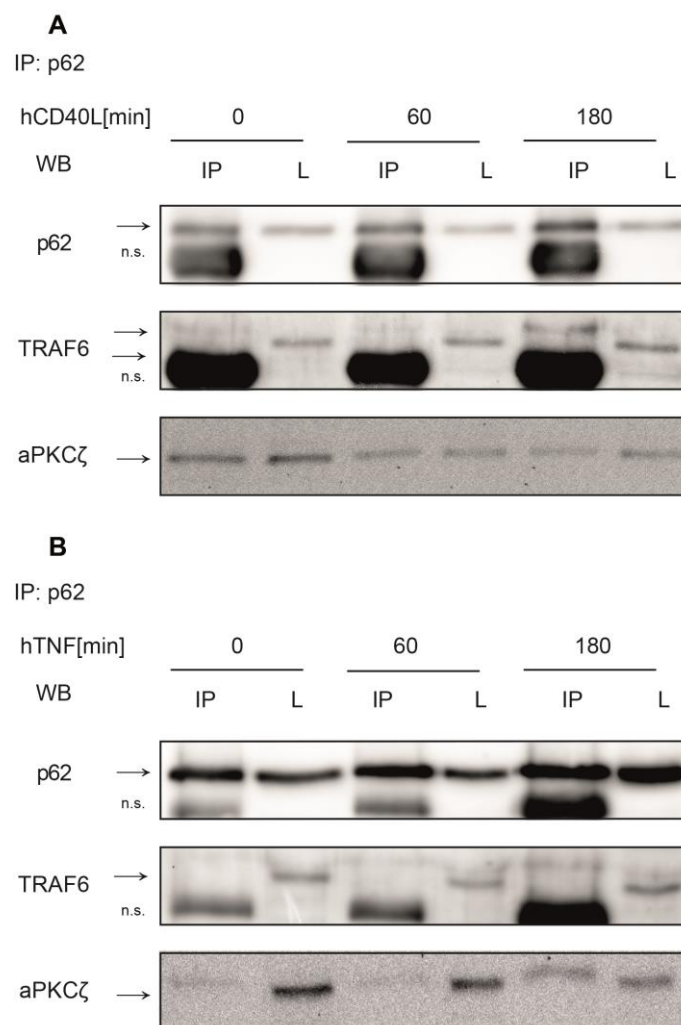


Abbildung 22: p62 Immunpräzipitation nach CD40L bzw. TNF Stimulation

2×10^7 786-O wurden mit 100 ng/mL humanen Fc-Flag-CD40L für 60 min und 180 min stimuliert oder blieben unbehandelt. Die Zellen wurden in TBS abgeschabt, in 1 mL MCBL-Lysepuffer aufgenommen und für eine Stunde lysiert. Das Lysat wurde mit 5 μ g Anti-p62 Antikörper über Nacht inkubiert und anschließend über Protein A Agarose präzipitiert. Die Proteine p62, TRAF6 und aPKC ζ wurden über Western-Blot detektiert.

Zusammengefasst konnte in der 786-O Nierenkarzinomzelllinie ebenfalls eine Anreicherung der TRAF6-p62- Bindung durch CD40 Stimulation beobachtet werden. Zudem konnte p62 neben TRAF2 und TRAF6 direkt am CD40 Rezeptorsystem nachgewiesen werden. Damit ist eine zellunabhängige Interaktion von p62 und TRAF6 an CD40 wahrscheinlich.

4.7 Der Knockdown von p62 in 786-O hatte keinen signifikanten Effekt auf die Aktivierung inflammatorische Signalwege

Da die Immunpräzipitationsexperimente für eine spezifische Interaktion von p62 und TRAF6 an CD40 sprechen, sollte überprüft werden ob eine p62 Defizienz in 786-O ähnliche Auswirkungen auf die inflammatorische Signaltransduktion zeigen wie in p62_{ΔST}-M-MØP. Daher wurde die Aktivierung von p38, Akt und die Phosphorylierung von IκBα nach CD40 Stimulation untersucht. Da 786-O Zellen nicht per se p62-defizient sind, wurde durch „*knockdown*“ mittels p62-spezifischer siRNA der Gehalt an p62 in 786-O herabreguliert. Die als Kontrolle transfizierte „*non-target*“ siRNA, wird über den gleichen Mechanismus von der Zelle aufgenommen, bindet aber nicht an mRNA. Die „*knockdown*“-Effizienz wurde über den Gehalt an p62 im Vergleich zur Ladekontrolle nach 24, 48 und 72 h überprüft und war 48 h nach Transfektion am höchsten. Zu diesem Zeitpunkt wurden die transfizierten Zellen mit CD40L stimuliert. Das Gesamt-Lysat wurde, wie auch CD40L stimulierte M-MØPs auf die inflammatorischen Signalwege κB, p38 und Akt untersucht (Abb. 21)

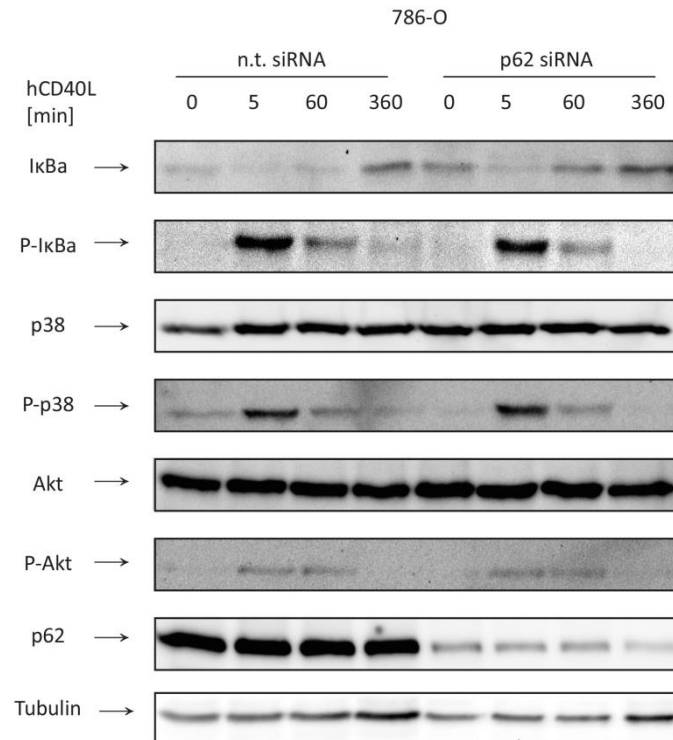


Abbildung 23: CD40L induzierte Signalwege in 786-O

3×10^5 Zellen wurden im 6-well ausgesät und mittels p62 siRNA oder n.t. siRNA für 48 h transfiziert. Anschließend wurden die Zellen mit 100 ng/mL hCD40L für 5, 60 und 360 min stimuliert oder blieben unbehandelt. Nach Erstellung eines Gesamtzelllysats wurden die angegebenen Proteine über Western Blot detektiert. Die *knock-down*-Effizienz in diesem Versuch zeigt die Menge an p62 im Vergleich zur Tubulin Ladekontrolle.

Zu den verschiedenen Zeitpunkten von 60 min und 6 h konnten nur schwache Verringerungen von Phospho-IκBa in p62siRNA transfizierten Zellen festgestellt werden. Allerdings war die Phosphorylierung von p38 oder Akt in allen Fällen unbeeinflusst vom p62 „*knockdown*“. So erfolgte sowohl in p62 siRNA transfizierten 786-O als auch in Kontroll-siRNA. 786-O eine Aktivierung dieser Signalwege 5 min und 60 min nach Stimulation. Um die möglichen Auswirkungen des abgeschwächten IκBa Phosphorylierung zu erforschen, wurden die Überstände der stimulierten Zellen auf die NF-κB Zielgene IL-6 und IL-8 untersucht (Abb. 22).

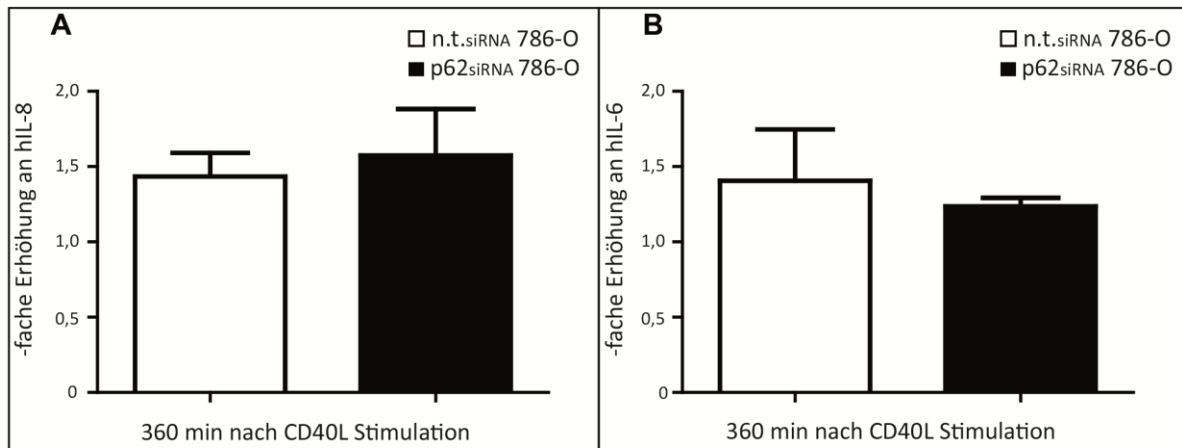


Abbildung 24: Vergleichbare Sekretion von hIL-8 und hIL-6 in p62siRNA- und Kontroll-siRNA transfizierten 786-O nach CD40L Stimulation

3×10^5 786-O wurden im 6-well Format mit p62siRNA bzw. n.t. siRNA transfiziert. 48 h später wurden die Zellen mit hCD40L (100 ng/mL) stimuliert und Überstände wurden nach 6 h abgenommen. Die Erhöhungsrates der Zytokin-Sekretion wurde über eine unstimulierte Probe ermittelt. Die Überstände wurden auf ihren Gehalt an hIL-8 (A) und hIL-6 (B) mittels ELISA untersucht.

Dabei wurde der Zytokin-Gehalt von hIL-8 und hIL-6 über ELISA bestimmt und gegen eine unstimulierte Probe normiert. Es konnten keine signifikanten Unterschiede in der Sekretion von hIL-8 (Abb. 22A) oder in der Sekretion von hIL-6 (Abb. 22B) zwischen Kontroll- siRNA 786-O und p62 siRNA 786-O detektiert werden. Dabei waren die Level des sekretierten hIL-6 aber insgesamt niedriger in p62 siRNA 786-O.

Zusammengenommen konnte durch die Transfektion von p62siRNA kein signifikanter Effekt auf die Phosphorylierung der inflammatorischen Signalwege p38, Akt und I κ B α sowie in der Aktivierung der NF- κ B Zielgene IL-8 und IL-6 in 786-O Zellen nachgewiesen werden. Allerdings handelt es sich bei diesen „*knockdown*“-Experimenten um Zellen mit reduziertem p62-Proteinlevel. Aus diesem Grund könnte, noch in der Zelle vorhandenes p62, die beobachtete Wirkung der vorhergegangenen Experimente mit M-MØPs kompensieren. Das p62 allerdings auch in 786-O ein Teil der durch CD40/CD40L ausgelösten Signalkaskade ist, dafür spricht der präzipitierbare Komplex.

5. Diskussion:

5.1. Das *bona fide* ER-Hoxb8 Makrophagensystem

In der unspezifischen Erregerabwehr dienen Makrophagen der Phagozytose des Erregers und beinhaltet die Produktion von Zytokinen und Chemokinen (95). Daher eignen sich Makrophagen für die Untersuchung von intrazellulären Erregern und für die Aktivierung von Signaltransduktionswegen über die auf Makrophagen exprimierten TNFR1- und CD40-Rezeptorsysteme (96). Aufgrund der Variation durch die Spender, der geringen Ausbeute und der aufwendigen Präparation ist der Einsatz von primären Makrophagen limitiert. Auf Basis einer Leukämiezelllinie existieren die murine Makrophagenzelllinie RAW 264.7 und humane monozytäre THP-1 Zelllinien. Dabei benötigen THP-1 eine Vorstimulation mit PMA um zu Makrophagen-ähnlichen Zellen auszdifferenzieren. Durch diese Stimulation werden allerdings bestimmte Genexpressionen so stark aktiviert, dass dadurch die Induktion von anderen Stimuli in reifen Makrophagen überdeckt werden (97). Um die Funktion von einzelner Genen oder Proteinen zu untersuchen, eignen sich daher Zellen und Zelllinien aus dem entsprechenden genetisch veränderten Tier. Dadurch werden „*off-target*“ Effekte, unvollständige Deletion des Zielproteins und Mischpopulationen wie sie durch Transfektion von DNA (Plasmide, siRNA) entstehen können minimiert. Um die TNFR1- und CD40-anhängigen Signalwege in einem adäquaten Makrophagen System zu untersuchen, wurden durch die Transfektion eines Hoxb8-Gens immortalisierte Progenitorzellen erstellt. Die Methode von Wang et al., liefert eine unbegrenzte Population an Vorläuferzellen, die zu Makrophagen ausdifferenziert werden können und auch mit zunehmender Passagenzahl konstant bleiben (88). Dabei wird, wie bei der Präparation von primären Makrophagen, M-CSF für die Ausdifferenzierung verwendet. Zudem können Zellpopulationen mit gezielten Genmutationen, durch die Benutzung von Knochenmarkszellen der entsprechenden *knockout* Maus, erstellt werden. In dieser Arbeit wurden die aus wt-, p62^{-/-} und p62_{ΔST} - Progenitorzellen erstellten Makrophagen charakterisiert. So konnte sowohl morphologisch als auch anhand der Oberflächenrezeptorexpression eine Ausdifferenzierung der Progenitorzellen zu Makrophagen beobachtet werden. Dieses Ergebnis entsprach nicht nur den selbstpräparierten Knochenmarksmakrophagen aus der Maus sondern auch den Beschreibungen aus der Literatur (88, 98) (Abb. 12 und Abb. 13).

Bei der in dieser Arbeit verwendeten C57BL/6 Mauslinie waren vermehrt Unterschiede im genetischen Hintergrund aufgetreten. Da die Zucht der ursprünglichen C57BL/6-Maus an zwei unterschiedlichen Orten (C57BL/6J - Jackson Laboratories und C57BL/6N - Nationale

Institute of Health) fortgeführt wurde, entstanden zwei Unterstämme, die sich in ihrem Genom und Phänotyp voneinander unterscheiden (99). Zu diesem Zeitpunkt wurde das Genom der verwendeten Mäuse auf 133 validierte SNP-Marker untersucht (Persönliche Mitteilung durch Dr. J. Gläsner, Universitätsklinikum Regensburg). Bei der genetischen Untersuchung der in dieser Arbeit verwendeten $p62^{-/-}$ -Mäuse wurde eine Mischung beider Unterstämme (44 % C57BL/6N) entdeckt. Aber auch der Hintergrund der getesteten wt-Mäuse war genauso durchmischt (45 % C57BL/6N). Allerdings konnte es nicht ausgeschlossen werden dass, beobachteten Effekte in den Experimenten durch einen unterschiedlichen genetischen Hintergrund verursacht wurden. Die richtige Kontrolle in diesem System ist die heterozygote Geschwisterkontrolle, die denselben genetischen Hintergrund entstammt. Aus diesem Grund wurden bei der Generierung von Zelllinien basierend auf der $p62_{\Delta ST}$ -Maus (83 % C57BL/6N) die Wurfgeschwister als Kontrolle eingesetzt. Dann wurden die bereits durchgeführten Experimente der inflammatorischen TNFR1-Aktivierung im $p62_{\Delta ST}$ -System mit der richtigen wt-Kontrolle wiederholt. So zeigten sowohl $p62^{-/-}$ -BMDM (Abb. 11) als auch in beiden erstellten Zelllinien $p62^{-/-}$ -M-MØP (Abb. 15) und $p62_{\Delta ST}$ -M-MØP (Abb. 17A) eine analoge Aktivierung von p38 und Akt, sowie Phosphorylierung von I κ B α nach TNF Stimulation. In diesem Fall kann daher weitgehend ausgeschlossen werden, dass der unterschiedliche genetische Hintergrund Einfluss auf die durchgeführten Experimente genommen hat. Durch die Benutzung des $p62_{\Delta ST}$ Systems kann zudem der Einfluss der Interaktion p62 und TRAF6 selektiv untersucht werden. Befunde verweisen daher direkt auf eine p62-TRAF6 Interaktion und schließen dabei andere Funktionen des pleiotropen Proteins aus.

5.2 Die duale Rolle von p62 auf inflammatorische Signalwege und der Einfluss auf das Infektionsgeschehen

Die Rolle von p62 in der Infektionsabwehr wurde in den letzten Jahren in verschiedenen Erregermodellen untersucht. Die Interaktionsfähigkeit von p62 mit LC3 und mit ubiquitinylierten Proteinen charakterisiert p62 als Transportprotein von intrazellulären Erregern zur autophagosomalen Degradation. Diese Studien zeigten, dass p62 direkten Einfluss auf die intrazelluläre, bakterielle Replikationsrate nimmt und Ubiquitin-markierte, antimikrobiell wirksame Proteinfragmente und Peptide an das Autophagosom rekrutiert (26). Neben dem autophagosomalen Abbau beeinflusst p62 inflammatorische Signalwege, wie TNFR1, deren Signaltransduktion ins Infektionsgeschehen eingreifen können. So konnte beobachtet werden, dass das inflammatorische Zytokin TNF eine p62-vermittelte Autophagozytose stimuliert (89). Nach einer Infektion sind Makrophagen als Teil der angeborenen Immunantwort, Zellen der

„first line“, sie leiten die Abwehrreaktion ein und sind für die Sekretion von Botenstoffen verantwortlich. Der Einfluss von p62 durch Modulation von inflammatorischen Signalwegen während einer Infektion wurde dabei in Makrophagen noch kaum untersucht. So ist während einer Listeriose die TNFR1-abhängige Signaltransduktion essentiell für die Eradikation der Erreger. Während TNFR1^{-/-}-Mäuse an dieser Infektion zugrunde gehen, wird die Infektion in wt Mäuse beherrscht (47). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit der Einfluss von p62-Defizienz bei einer Listerieninfektion in Knochenmarksmakrophagen untersucht. In dieser Arbeit konnte kein nachteiliger Effekt durch p62-Defizienz in Bezug auf die Erreger-Replikation in Makrophagen bewiesen werden (Abb. 9). Zudem konnte der Einfluss von TNF als Autophagozytose stimulierendes Zytokin bei einer Listerieninfektion über die Anreicherung von LC3II (LC3-phosphatidylethanolamin Konjugat, Bestandteil der Autophagosomenmembran) wie von Mostowy in HeLa-Zellen beschrieben (89), in dieser Arbeit nicht beobachtet werden. Nur die Vorbehandlung mit IFN γ , nicht aber TNF, hatte eine Verbesserung der Listerien Abwehr zur Folge (Abb. 9B und Abb. 9C). Dieser IFN γ -abhängige Effekt wurde bereits beschrieben und ist vor allem auf die Aktivierung der Makrophagen zurückzuführen (100). Laut einer Studie von Yoshikawa et al., entgehen Wildtyp Listerien der autophagosomalen Abwehr durch eine auf Polymerisierung von wirtseigenem Aktin basierende Beweglichkeit. Durch die Verwendung von immotilen Listerien, sogenannte Δ actA-Listerienmutanten, konnte eine erhöhte Ubiquitinierung und Rekrutierung von p62 am Bakterium, sowie eine verbesserte autophagosomale Abwehr nachgewiesen werden. Diese Studie zeigte, dass in murinen embryonale Fibroblasten und HeLa-Zellen, p62 für die autophagosomale Abwehr von Δ actA Listerienmutanten verantwortlich ist (101). Daraus kann geschlossen werden, dass p62 die Replikationsrate von intrazellulären Erregern vornehmlich über die autophagosomale Abwehr reduziert. Entgeht ein Erreger diesem Abwehrmechanismus, wie *Listeria monocytogenes* EGDe, so wirkt sich eine p62-Defizienz möglicherweise nicht darauf aus. Eine Modulation des Infektionsgeschehens in Makrophagen durch die alleinige Gabe von exogenen TNF scheint dabei zweitrangig zu sein. Da bei einer IFN γ Stimulation endogen TNF gebildet wird, ist ein synergistischer Effekt von IFN γ und TNF wahrscheinlich. Dies zeigten auch Studien an TNFR1^{-/-}-BMDMs. Hier hatte die Gabe von IFN γ keinen protektiven Effekt auf die Erregerreplikation bei einer Infektion mit *Listeria monocytogenes* EGDe in TNFR1^{-/-}-Makrophagen (102). Daher ist Signaltransduktion von TNFR1 nach der Aktivierung der Makrophagen über IFN γ essentiell. Aus diesem Grund wurde der Einfluss von p62 auf TNFR1-abhängige Signalwege in Makrophagen untersucht. In den Studien von Sanz et al., wirkte sich die Transfektion eines p62 „anti-sense“ Konstrukts negativ auf die TNFR1-

abhängige NF- κ B Aktivierung aus. Diese Modulation der TNFR1-Signalwege wird über die Bildung einer Signalplattform durch die Interaktion von p62 mit aPKC ζ erklärt (11). Daher war es anfänglich überraschend, dass in dieser Arbeit weder im TNF-stimulierten Infektionsmodell (Abb. 9B), noch in der TNFR1-abhängigen Signaltransduktion Effekte durch p62-Defizienz auftraten. So konnten weder in der Aktivierung von p38, ERK und Akt sowie in der I κ B α Phosphorylierung Unterschiede zwischen wt- und p62^{-/-}-Zellen in BMDM (Abb. 11), oder M-MØPs (Abb. 15) beobachtet werden. Die Diskrepanz in der p62-abhängigen NF- κ B Aktivierung durch TNFR1 Stimulation wie von Sanz et al. beobachtet, sowie der protektive Zusammenhang durch TNF Stimulation und der autophagosomalen Anreicherung von LC3II und p62 im Listerieninfektionsmodell (89), lassen sich möglicherweise durch das unterschiedliche Zellmodell erklären: Während in dieser Studie mit murinen BMDM und der Makrophagenzelllinie M-MØP gearbeitet wurde, wurden die Studien von Sanz et al und Mostowy et al in HeLa-Zellen durchgeführt. Für eine zellspezifische NF- κ B Aktivierung nach TNF Stimulation spricht eine Studie mit PKC ζ ^{-/-}-MEFs. Diese Zellen weisen ebenfalls eine stark reduzierte Aktivierung von NF- κ B durch TNF auf. Allerdings konnte auch eine normale IKK Aktivierung in Leberhomogenat von PKC ζ ^{-/-}-Mäusen gezeigt werden (103).

Neben den Effekten von p62 auf die Erregereradikation wurden auch die Auswirkungen einer p62-Defizienz auf weitere, an der Erregereradikation beteiligte Signalwege untersucht. Obwohl *in vitro* kein direkter Einfluss von p62 im Infektionsversuch mit *Listeria monocytogenes* nachgewiesen werden konnte, könnte ein indirekter vermittelter Effekt, wie die Sekretion von inflammatorischen Zytokinen und die Aktivierung anderer Immunzellen dennoch zu einer verbesserten Erregereradikation *in vivo* beitragen. Die Signalwege von TLRs und TNFR1 dienen vor allem der Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B, was u.a. in der Expression des Zielgens TNF und der Vorläuferform von IL-1 β (pro-IL-1 β) resultiert. Pro-IL-1 β wird durch aktive Caspase-1 gespalten, bevor es sezerniert werden kann. Pathogen-assoziierte Strukturen werden einerseits durch Rezeptoren wie TLRs als auch durch „NOD-like“ Rezeptoren (NLR) erkannt. Die NLR sind Bestandteil eines cytosolischen Multiproteinkomplexes, dem Inflammasom. Durch die Pathogen-assoziierte Inflammasombildung wird Caspase-1 aktiviert und nachfolgend pro-IL-1 β gespalten. Anschließend kann durch die Sezernierung von aktiven IL-1 β die Entzündungsreaktion ausgelöst werden (91). Im Rahmen der intrazellulären Infektionsabwehr wurden die inflammatorische Zytokine TNF und IL-1 β untersucht. Dabei konnte festgestellt werden, dass p62 auch für die Regulation der IL-1 β Induktion und Sekretion während der Infektion verantwortlich ist. Eine p62-Defizienz erhöhte dabei die Sek-

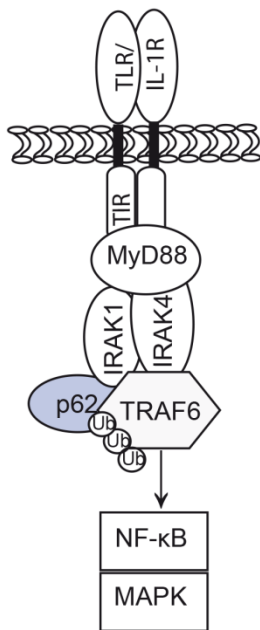
retion von IL-1 β in BMDM, veränderte aber nicht die Ausschüttung von TNF im Vergleich zum wt (Abb. 10). Diese Ergebnisse sind in wesentlichen Punkten vergleichbar mit der Arbeit von Ohtsuka et al. So konnte bei einer Infektion mit Legionellen gezeigt werden, dass eine p62-Defizienz keine Auswirkung auf die bakteriellen Wachstumsraten hatte. Jedoch wurde das inflammatorische und antimikrobiell wirksame Zytokin IL-1 β ebenfalls verstärkt sezerniert. Dabei wird im p62 „knockout“ die erhöhte IL-1 β Sekretion über die fehlende, p62-vermittelte Reprimierung der Inflammasomaktivierung erklärt (104).

In einem Infektionsmodell mit *Mycobacterium abscessus* in humanen Makrophagen (MDMs und THP-1) konnte ein anderer Einfluss von p62 auf die infektionsbedingte IL-1 β Sekretion beobachtet werden. So wurde bei einem „knockdown“ von p62 mittels „short hairpin“ siRNA die Sekretion von IL-1 β , TNF und IL-8 während der Infektion mit Mykobakterien massiv vermindert. Die Mechanismen über die p62 die IL-1 β Sekretion dabei moduliert sind noch nicht vollständig geklärt. Sicher ist dabei nur, p62 beeinträchtigt bereits die Expression der pro-IL-1 β Form sowie die Caspase-1 Spaltung ohne dabei auf die Inflammasomkomponenten einzuwirken (105). Die mit dieser Arbeit durchgeführte funktionelle Testung der M-MØP über die Zytokinsekretion von TNF und IL-1 β nach LPS Stimulation lieferte einen ähnlichen Befund. In p62^{-/-}-M-MØP wurde kaum IL-1 β sekretiert. Dabei entsprach die TNF-Sekretion in p62^{-/-}-M-MØP den Werten die von wt-M-MØP sekretiert wurden (Abb. 14). Diese Ergebnisse passen zu den Befunden von Lee et al., stehen aber im Kontrast zu der erhöhten IL-1 β Sekretion in p62-defizienten BMDM nach einer Listerieninfektion (Abb. 10B). Diese Unterschiede sind teilweise durch die Vielzahl an Signalwegen wie Autophagozytose und Inflammasomaktivierung, die während einer Infektion eine Rolle spielen erklärbar. Ferner unterscheiden sich die verwendeten Pathogene in ihren Evasionstrategien die auf die Immunantwort Einfluss nimmt. *Listeria monocytogenes* EGDe entgeht der Autophagie über eine durch Polymerisierung von wirtseigenem Aktin basierende Beweglichkeit. Auch Legionellen entgehen der autophagosomalen Abwehr durch Dekonjugation von LC3 während der Autophagosomenmaturierung (106). Im Gegensatz dazu werden Mykobakterien effektiv über Autophagozytose abgebaut. Dabei ist die protektive Wirkung von p62 (Rekrutierung der Bakterien zum Autophagosom und Bereitstellung antimikrobieller Proteine) bei diesem Prozess von Ponpuak et al., bereits beschrieben worden (26). Während viele Funktionen von p62 in der Autophagozytose gut untersucht sind, gibt es kaum strukturelle Untersuchungen zu der Rolle von p62 in der Inflammasomaktivierung. Dieser Prozess scheint mit der Autophagozytose im Zusammenhang zu stehen. Bisher konnte die Beobachtung gemacht werden, dass p62 für die

Aktivierung von Caspase-1 und damit auch für die Sekretion von IL-1 β bedeutsam ist (107). Daneben scheint p62 auch in der Repression der Inflammation, durch autophagosomalen Abbau, wie von Ohtsuka beschrieben, eine Rolle zu spielen (104). In diesem Zusammenhang wird deutlich, dass p62 mit den wichtigsten Systemen der Erregerabwehr in Verbindung steht und regulatorisch auf diese einwirken kann.

Die verminderte IL-1 β Sekretion nach LPS Stimulation in p62^{-/-}-M-MØP passte insoweit zu unserer Hypothese, dass p62 möglicherweise über TRAF6 die Induktion von inflammatorischen Signalwegen moduliert. Allerdings finden sich in der Literatur Beobachtung zu p62 in der TLR/IL-1R-abhängigen Signaltransduktion, die den bilateralen Charakter von p62 skizzieren: Einerseits wird p62 mit der Entstehung einer hyperinflammatorischen Antwort assoziiert, andererseits dient p62 als Negativ Regulator einer inflammatorischen Signalantwort. Dabei spielt der Abbau von p62 über proteasomale (über die E3-Ubiquitin Ligase Cullin-3) und autophagosomale Signalwege in der Modulation von TLR/IL1R- abhängigen Signalwegen eine Rolle. So konnte gezeigt werden, dass bei einer Blockierung dieser Degradationsmechanismen, p62 akkumuliert und dies in einer Hyper-inflammatorischen Antwort durch IL-1R resultiert (108). Ähnliche Beobachtungen konnte man in Keratinozyten bei TLR2 Stimulation machen. So verhindert Autophagozytose die exzessive Entzündungsantwort durch p62-Akkumulation. Auf der anderen Seite hatte p62 RNA-„silencing“ in Keratinozyten den Abbruch der NF- κ B Aktivierung und damit verbundene erniedrigte IL-6 und TNF Level zur Folge (109). Daher spielen bei der NF- κ B-abhängigen Signaltransduktion über p62 die Ubiquitinierung von TRAF6 und deubiquitinylierende Enzyme für die Regulation der Signalantwort eine erhebliche Rolle. Diese Befunde machen die duale Rolle von p62 bewusst. Durch die p62-abhängige K63-Polyubiquitinylierung an Proteinen wie TRAF6 wird die inflammatorische Signaltransduktion moduliert. Zudem interagiert p62 mit deubiquitinylierenden Enzymen wie CLYD und der autophagosomalen Degradation. Dadurch kann die Induktion von inflammatorischen Zytokinen inhibiert werden. Aus diesem Grund ist eine zweiseitige regulatorische Rolle von p62 nach TLR/IL1-R Stimulation möglich. Bindet p62 über MyD88 an TRAF6, katalysiert p62 die Autoubiquitinylierung von TRAF6, die zur NF- κ B Aktivierung führt. Bindet p62 stattdessen an deubiquitinylierende Enzyme, reduziert p62 die TRAF6-abhängige Autoubiquitinylierung und schwächt die NF- κ B Aktivierung ab (Abb. 25).

PRO-INFLAMMATORISCH



ANTI-INFLAMMATORISCH

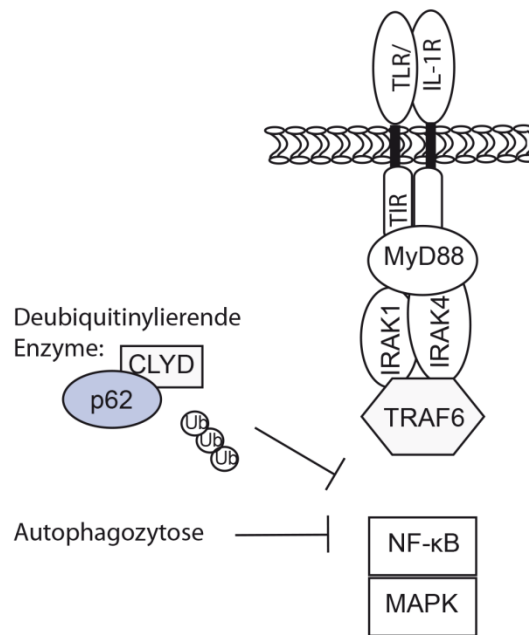


Abbildung 25: Wirkungsmechanismen der p62-abhängigen Modulation von inflammatorischen Signalwegen

Durch die Bindung an TRAF6 ermöglicht p62 die Oligomerisierung und Autoubiquitinylierung die nachfolgend die inflammatorische Signaltransduktion einleitet. Die Signaltransduktion wird dabei durch die Bindung von p62 an das deubiquitinylierende Enzym CLYD und durch die Degradation von p62 über die Autophagozytose negativ reguliert.

Eine generelle Rolle von p62 ist daher schwer hervorzusagen und hängt von mehreren Faktoren ab. So kann die Verfügbarkeit von Adapterproteinen wie TRAF6 oder CLYD bereits Einfluss auf das Gleichgewicht nehmen. Inflammatorische Signalwege wie NF-κB und MAPK werden unterschiedlich stark ausgelöst, abhängig vom Zelltyp und Stimulus. Zudem gilt es zu beachten, dass im Infektionsgeschehen mehrere Signalkaskaden wie das Inflammasomaktivierung und Autophagozytose involviert sind, die sich gegenseitig beeinflussen.

5.3 p62 als Modulator von CD40- assoziierten Signalwegen

Die Bildung eines funktionellen p62-TRAF6 Komplexes wurde bereits in verschiedenen Systemen beschrieben. Die durch diesen Komplex ausgelöste Autoubiquitinylierung von TRAF6 ist ein kritischer Faktor in der inflammatorischen Signaltransduktion von T-Zell Rezeptor und von TLR/IL-1R (12, 110). Nach Aktivierung von CD40 Rezeptorsystem werden ebenfalls TRAF-Moleküle rekrutiert. Eine effiziente pro-inflammatorische Signaltransduktion von CD40 erfordert neben TRAF2 auch TRAF6. So wird die Aktivierung der IκB-Kinase, durch eine fehlende TRAF6 Bindungsstelle am Rezeptor, in Monozyten und Makrophagen bereits 20-30 min nach Stimulation empfindlich eingeschränkt (111). Dabei wurden die Rolle von p62 und die mögliche Interaktion mit TRAF6 im CD40 Rezeptorsystem noch nicht untersucht. So

konnte in dieser Arbeit beobachtet werden, dass bei p62-Defizienz (p62 Δ ST-M-MØP) die CD40-abhängige NF- κ B Aktivierung eingeschränkt war (Abb. 17A). Dabei wurde 5 min nach Stimulation I κ B α sowohl in wt M-MØP als auch p62 Δ ST-M-MØP phosphoryliert. Auffällig war, dass 60 min nach Stimulation in wt-M-MØP eine Detektion von Phospho-I κ B α zu einem späterem Zeitpunkt in p62 Δ ST-M-MØP nicht mehr möglich war. Dazu passen die Befunde, die zu p62 im TRAF6- bindenden RANK-System gemacht wurden: Die NF- κ B Aktivierung ist im p62-defizienten System wenige Minuten nach Stimulation intakt, während das Langzeitsignal unterbrochen ist. Offenbar ist der TRAF6-p62 Komplex eher für eine späte NF- κ B Aktivierung von Bedeutung (78). Das die NF- κ B Aktivierung nicht völlig eingeschränkt ist, und andere inflammatorische Signalwege wie p38 unbeeinflusst bleiben, ist möglicherweise durch die Bindung von mehreren Adapterproteinen an CD40 erklärbar. So wird nicht nur TRAF6 an den Signalkomplex rekrutiert, sondern auch TRAF2 und TRAF3 (112). Die genauen Mechanismen der Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen sind noch nicht bekannt, bzw. variieren in den verschiedenen getesteten Zellmodellen. So wurde beispielsweise die TRAF6 unabhängige Aktivierung von p38 über TRAF3 in B-Zellen beschrieben (113). Zudem sind Interaktionen von TRAF6 mit anderen TRAF-Molekülen unabhängig von der CD40 Rezeptorbindungsstelle beschrieben. So konnte in Fibroblasten eine Bindung und Signaltransduktion von TRAF6 über TRAF2 bei fehlender TRAF6 Bindungsstelle an CD40 beobachtet werden (83). Daher ist eine kooperative Rolle von TRAF2 und TRAF6 an CD40 wahrscheinlich, in dem bei Verlust einer Komponente die andere kompensierend in das Signalgeschehen eingreift.

Die verringerte I κ B α Phosphorylierung in p62 Δ ST-M-MØP weist auf eine geminderte NF- κ B Aktivierung hin und hatte zudem eine geringere Sekretion des NF- κ B Zielgens IL-6 zur Folge, verglichen mit wt-M-MØP (Abb. 18B). Dabei blieb die TNF-Sekretion von der p62-Defizienz in M-MØPs unbeeinflusst (Abb. 18A). In der Literatur finden sich ähnlich Befunde in Bezug auf die Rolle von TRAF6 in der proinflammatorischen Signalaktivierung. So zeigten Monozyten und Makrophagen mit defekter TRAF6 Bindungsstelle am Rezeptor eine stark reduzierte NF- κ B Aktivierung. Wurde TRAF6 aus dem System über TRAF6-Bindungsproteine entfernt, hatte dies eine Reduktion der Zytokinsekretion von IL-6 und TNF zur Folge. Dieselbe Beobachtung konnte durch den Einsatz von TRAF6 Dominant-Negativ Konstrukten gemacht werden (111). Diese Befunde fügen sich insoweit gut ein, da die TRAF6-CD40 Signalachse wichtig für NF- κ B Aktivierung und die IL-6 Sekretion ist. Der Einfluss der CD40-TRAF6 Signaltransduktion auf die TNF-Sekretion, könnte durch den Ein-

satz von unterschiedlicher Methodik erklärt werden. Eine Absättigung von TRAF6 Bindungsstellen bzw. dem Molekül selbst, erschöpft alle möglichen Signaltransduktionswege von TRAF6, auch in Kooperation mit anderen TRAF-Molekülen. Damit wäre auch die von Davies et al. beschriebene NF- κ B Aktivierung über die Interaktion von TRAF2 mit TRAF6 inkludiert (83). Dieser TRAF2-abhängige Signalweg wird durch die Verwendung von p62 $_{\Delta$ ST-Zellen nicht beeinflusst, anders bei der Verwendung von TRAF6 Dominant Negativ Konstrukten. Die mit dem wt vergleichbare TNF-Sekretion von p62 $_{\Delta$ ST-M-MØP in dieser Arbeit wird zudem möglicherweise durch die intakte TNFR1 Signaltransduktion in p62-Defizienten M-MØP beeinflusst (Abb. 15 und Abb. 17B). Durch die anfänglich funktionierende I κ B α Phosphorylierung kann TNF gebildet werden. Dies könnte eine autokrine Selbstaktivierung über TNFR1 auslösen, in dessen Folge TNF akkumuliert.

In der Nierenkarzinomzelllinie 786-O wurde ebenfalls die Auswirkung von p62-Defizienz durch siRNA vermittelten „*knockdown*“ auf die CD40-abhängige Signaltransduktion untersucht. Dabei variierte die Abnahme der I κ B α Phosphorylierung in den unabhängigen Experimenten (Abb. 21). Zusammengenommen konnte kein so ausgeprägter Effekt wie in den Versuchen mit p62 $_{\Delta$ ST-M-MØP beobachtet werden. Zudem waren die Sekretionslevel der untersuchten Zytokine IL-6 und IL-8 vom p62 „*knockdown*“ unbeeinflusst (Abb. 22). Diese Befunde lassen keinen allgemeinen Schluss zu, da p62 über einen „*knockdown*“ nicht völlig aus dem System entfernt werden kann. Möglicherweise reichen die verbleibenden Proteinmengen an p62 aus, um TRAF6-abhängige Signalwege in 786-O Zellen zu modulieren. Dafür spricht, dass ein Zusammenhang zwischen p62 und dem CD40 Rezeptorkomplex hergestellt werden konnte. So wurde bereits in M-MØP bei einer Immunpräzipitation von p62 nach CD40 Stimulation eine vermehrte Anreicherung von TRAF6 an p62 beobachtet (Abb. 19). Zusätzlich konnte auch in der Nierenkarzinomzelllinie 786-O sowohl die Bildung eines TRAF6-p62-abhängigen Komplex (Abb. 24), als auch die direkte Interaktion von p62 mit CD40 (Abb. 23) gezeigt werden. Die Ergebnisse aus den Immunpräzipitationsexperimenten lassen eine zweistufige Aktivierung des CD40 Signalkomplex vermuten. CD40 verfügt über eine relativ kleine cytoplasmatische Domäne, daher kann immer nur ein TRAF-Molekül an CD40 binden. Das heißt TRAF2 und TRAF6 kompetitieren um die Bindung an CD40, wenngleich an verschiedenen Bindungsstellen (114). Bisher konnte eher eine bevorzugte Bindung von TRAF2 an CD40 beobachtet werden, trotz gleicher Bindungsaffinität von TRAF2 Und TRAF6 an CD40 (115). Dafür spricht auch, dass 60 min nach Stimulation eine stärkere Assoziation von TRAF2 an CD40 während der Immunpräzipitation detektiert werden konnte (Abb. 23). Bei

fortschreitender Stimulation könnte die TRAF6 Bindung an den Rezeptor und die p62-abhängige Oligomerisierung und Autoubiquitinylierung von TRAF6 für die NF- κ B Aktivierung von Bedeutung sein (Abb. 26).

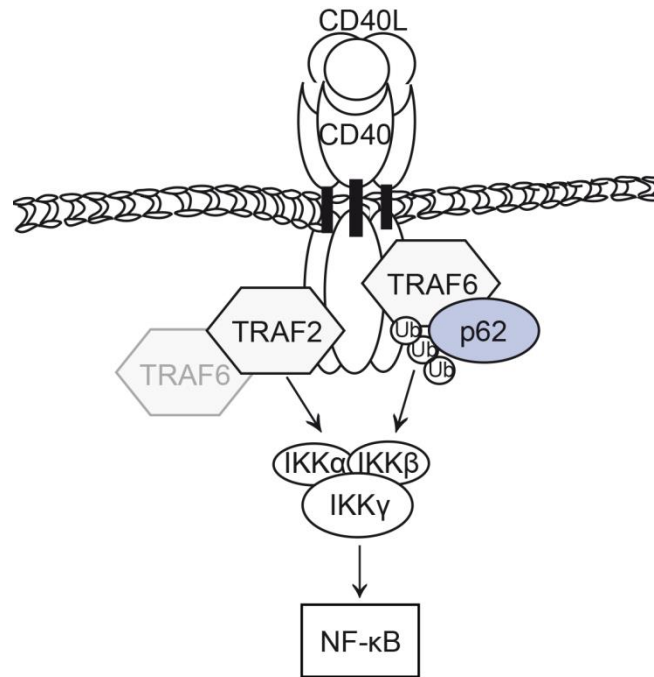


Abbildung 26: Modell der CD40-abhängigen NF- κ B Aktivierung über p62

Die Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen durch CD40 erfolgt durch die Rekrutierung der Adapterproteine TRAF2 und TRAF6. Neben der Aktivierung von inflammatorischen Signalwegen über TRAF2 sind auch Interaktionen von TRAF6 gebunden an TRAF2 möglich. Der CD40-TRAF6-p62 Signalkomplex könnte die Oligomerisierung und Autoubiquitinylierung von TRAF6 und damit dessen Aktivierung fördern. Dadurch werden IKK und anschließend NF- κ B aktiviert.

Mit der in dieser Arbeit vorgestellten Rolle von p62 in der CD40-TRAF6-abhängigen Signaltransduktion stellt möglicherweise ein fehlendes Bindeglied, zu einer Beobachtung die von Chatzigeorgiou et al., beschrieben wurde, dar. So konnte durch die Blockierung der CD40-TRAF6 Signalachse die Sensitivität gegenüber Insulin in fettleibigen Mäusen deutlich gesteigert werden. Die Gruppe stellt damit ein mögliches therapeutisches Angriffsziel in der durch Fettleibigkeit ausgelösten Insulinresistenz vor (116). Dabei zeigen p62-Defiziente Mäuse genau diesen Phänotyp: Diese Mäuse entwickeln eine Insulinresistenz infolge von Fettleibigkeit (32). Einen direkten Zusammenhang zwischen der Modulation von CD40-TRAF6 Signalwege durch p62 und die durch Fettleibigkeit induzierte Insulinresistenz müssen allerdings zukünftige Studien zeigen.

6. Zusammenfassung:

p62 als ist pleiotropes Protein in die verschiedensten Signalwege involviert. Dabei ist die Verbindung von p62 zum lysosomalen- und autophagosomalen- Signalweg als auch die Fähigkeit zur Vermittlung von K63-Polyubiquitin Ketten entscheidend. Zum einen werden über p62 die Erregereradikation und die Entstehung einer Entzündungsreaktion im Infektionsgeschehen reguliert, zum anderen werden inflammatorische Signalwege über Adapterproteine wie aPKC ζ und TRAF6 moduliert.

In dieser Arbeit konnte der Einfluss von p62 auf eine Infektion mit *Listeria monocytogenes* EGDe und auf die TNFR1- und CD40- abhängige Signaltransduktion untersucht werden. Dabei wurde ein *bona fide* Makrophagenzellsystem, basierend auf Hoxb8 immortalisierten Knochenmarkzellen etabliert. Durch den Vergleich von Makrophagen aus p62^{-/-}- und p62 Δ ST-Mäusen mit wt-Zellen konnte die Wirkung von p62 im Detail untersucht werden. Zusätzlich konnte durch die verwendete Deletionsmutante p62 Δ ST, die eine Deletion der TRAF6 Bindungsstelle von p62 aufweist, selektiv die Interaktion von p62 mit TRAF6 analysiert werden ohne dabei mit anderen Funktionen dieses pleiotropen Proteins zu interferieren. Während einer Infektion mit dem intrazellulären Erreger *Listeria monocytogenes* EGDe hatte eine p62-Defizienz keine Relevanz in der Erregereradikation in BMDM. Allerdings konnte eine erhöhte Sekretion von IL-1 β in p62-defizienten BMDM im Vergleich zu wt-BMDM festgestellt werden. Auf der anderen Seite wurde durch p62-Defizienz die Verringerung von inflammatorischen Signalwegen beobachtet. So wurde die IL-1 β Sekretion nach LPS Stimulation in p62^{-/-}-M-MØP empfindlich reduziert. Diese Divergenz, ist zum einen durch die methodischen Unterschiede erklärbar passen aber auch zu dem in der Literatur beschriebenen dualen Charakter von p62. So ist dieses Protein, abhängig von Faktoren wie Autophagozytose und Inflammation, sowohl in die Modulation von pro-inflammatorische- als auch anti-inflammatorische- Signalwege involviert.

Die Bindung an aPKC ζ und Regulation von NF- κ B über TNFR1 Signalwege wird in der Literatur beschrieben, ein Einfluss auf die Makrophagen-abhängige TNFR1 Signaltransduktion konnte in dieser Arbeit jedoch nicht beobachtet werden. Vielmehr konnte die Einwirkung von p62 auf die TRAF6- abhängige NF- κ B Aktivierung durch CD40 Stimulation in M-MØP beobachtet werden. Die durchgeführten Versuche zeigten eine verringerte NF- κ B Aktivierung in p62 Δ ST-M-MØP, was in der reduzierten Sekretion des NF- κ B Zielgens IL-6 resultierte. Zudem

beschreibt diese Arbeit zum ersten Mal die Bildung eines Rezeptorsignalkomplexes bestehend aus CD40, TRAF6 und p62. Damit zeigt diese Arbeit die Funktion von p62 in der CD40-abhängigen Signaltransduktion, die auf eine modulatorische Funktion von p62 in TRAF6-bindenden Rezeptoren der TNF-Rezeptor-Familie hinweist.

7. Summary:

The pleiotropic protein p62 is involved in various signaling pathways. Thereby, p62 is regulating lysosomal and autophagosomal degradation and the linkage of K63-polyubiquitin chains. Firstly, p62 participates in bacterial eradication and the inflammatory response during infection. Furthermore, inflammatory signaling pathways are modulated via adapter proteins such as α PKC ζ and TRAF6.

In this study, the influence of p62 on infection with *listeria monocytogenes* and the impact on TNFR1- and CD40- dependent signal transduction was observed. For this purpose, a *bona fide* macrophage cell system was established, based on Hoxb8 immortalized bone marrow cells. By comparing macrophages derived from p62^{-/-} and p62 Δ ST mice, the effect of p62 could be studied in detail. Furthermore, the mutant p62 Δ ST with a deleted TRAF6-binding domain of p62 is a tool to limit observed effects uniquely to the interaction between p62 and TRAF6 without interfering with other functions of the pleiotropic protein p62. The deficiency of p62 in BMDM during an infection with the intracellular pathogen *listeria monocytogenes* had no relevance in pathogen eradication. However, IL-1 β secretion was increased in p62^{-/-}-BMDM compared to wt-BMDM. But p62-deficiency was also associated with an overall decrease in inflammatory responses. In this case, IL-1 β production was reduced in p62^{-/-}-M-MØP after LPS stimulation. This contrast might on the one hand be due to the methodical differences in the studies and on the other hand be explained by the described dual character of p62. This protein depending on factors such as autophagy and inflammasome activation is involved in the activation of both pro-inflammatory and anti-inflammatory signaling pathways.

The described binding of p62 to α PKC ζ and regulation of NF- κ B over TNFR1 signaling could not be observed in macrophages in this work, but rather an influence of p62 on TRAF6-dependent NF- κ B activation after CD40 stimulation in M-MØP. The performed experiments showed a diminished NF- κ B activation in p62 Δ ST M-MØP, resulting in reduced secretion of the NF- κ B target gene IL-6. Furthermore, a signal receptor complex consisting of CD40, TRAF6 and p62, is described here for the first time. For this reason, this work showed a functional role of p62 in CD40-dependent signal transduction and indicates a modulatory function of p62 in TRAF6 binding receptors of the TNF receptor family.

Anhang:

Abkürzungsverzeichnis:

Abb.	Abbildung
APC	Allophycocyanin
aPKC	atypische Proteinkinase C
APS	Ammoniumpersulfat
AS	Aminosäure
cIAP	“Cellular Inhibitor of Apoptosis Proteins”
CRD	Cystein-reiche Domänen
DAMP	“Danger -associated molecular patterns”
DD	“Death domain”
DISC	“Death inducing signaling complex”
ECL	“Enhanced chemiluminescence”
ELISA	“Enzyme linked immunosorbent assay”
ERK	“extracellular signal-regulated Kinase”
FADD	“Fas associated death domain”
FCS	fötales Kälberserum
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
h	Stunde
HDAC6	“Histone deacetylase 6”
HRP	Horse Radish Peroxidase
IKK	I κ B Kinase
IL	Interleukin
IL-1R	Interleukin 1 Rezeptor
IFN γ	Interferon γ
I κ B α	Inhibitor of NF κ B α
IRAK	IL-1Rezeptor assoziierte Kinase
JNK	c-Jun NH ₂ -terminal Kinase
kDa	Kilodalton
LC3	“microtubule-associated protein light chain 3”
LIR	“LC3 interacting region”
M	Molarität

M-CSF	“Macrophage colony stimulating factor”
MOI	“Multiplicity of Infection”
mA	Milliampere
MAP2K	“Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase”
MAP3K	“Mitogen-Activated Protein Kinase Kinase Kinase”
MAPK	“Mitogen-Activated Protein Kinase”
NEMO	“NF-κB essential modulator”
NF-κB	“nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells”
NIK	“NF-κB inducing kinase”
ng	Nanogramm
NGF	„Nerve growth factor“
NGFR	“Nerve growth factor receptor”
NLS	„Nucleus localisation sequence“, Kernlokalisationssequenz
OD	Optische Dichte
p38 MAPK	„p38 Mitogen Activated Protein Kinase“
PAGE	Polyacrylamid Gelelektrophorese
PAMP	“Pathogen-associated molecular patterns”
PB1	Phox und Bem1-p-1 Domäne
PBS	“Phosphate Buffered Saline”
PE	Phycoerythrin
PDK1	“Phosphoinositide-dependent kinase-1”
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PIP2	Phosphatidylinositolbisphosphat
PIP3	Phosphatidylinositoltrisphosphat
PLAD	„pre-ligand binding assembly domain“
RANK	“Receptor Activator of NFκB”
RANK-L	RANK-Ligand
RING	“Really interesting new gene”
RIP1	“Receptor interacting protein 1”
SDS	Natriumdodecylsulfat
TACE	“TNF converting enzyme”
TAK	TGFβ-aktivierte Kinase
TBS-Domäne	“TRAF binding site”

TBS	Tris Buffered Saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
THD	“TNF homology domain”
TIR	Toll-/Interleukin 1 Receptor
TLR	“Toll like receptor”
TNF	“Tumor Necrosis Factor”
TNFR	“Tumor Necrosis Factor Receptor”
TRADD	“TNF-Receptor Associated Death Domain”
TRAF	“TNF Receptor Associated Factor”
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
UBA	“Ubiquitin-associated domains”
ZZ	Zink Finger

Abbildungsverzeichnis:

Abbildung 1: Aufbau und Funktionen des Proteins p62	3
Abbildung 2: Übersicht über die TNF-Rezeptor Superfamilie und ihre Liganden	6
Abbildung 3: TNFR1 Signaltransduktion	8
Abbildung 4: Übersicht über das CD40/CD40L-System	9
Abbildung 5: Aktivierung des Transkriptionsfaktors NF- κ B durch TNFR1 Signaltransduktion	11
Abbildung 6: Aktivierung des klassischen und alternativen NF- κ B Signalwegs im CD40/CD40L System	12
Abbildung 7: Die MAPK Kaskaden.....	13
Abbildung 8: Schema der Signaltransduktion des TLR/IL-1R- Systems über MyD88 und TRAF6....	16
Abbildung 9: Wachstumskurven von <i>Listeria monocytogenes</i> in wt und p62 ^{-/-} BMDM nach unterschiedlicher Stimulation.....	35
Abbildung 10: Zytokinsekretion von wt und p62 ^{-/-} BMDM nach Infektion mit <i>Listeria monocytogenes</i>	36
Abbildung 11: Die TNF induzierte inflammatorische Signaltransduktion wird in BMDMs nicht durch p62-Defizienz beeinflusst.....	38
Abbildung 12: Diff Quick Färbung der MØP während ihrer Ausdifferenzierung zu M-MØP.....	40
Abbildung 13: Oberflächenexpression von Makrophagenmarker in Progenitorzellen (MØP), ausdifferenzierten, IFN γ aktivierten Makrophagen (M-MØP) und Knochenmarksmakrophagen (BMDM).....	41
Abbildung 14: LPS induzierte IL-1 β Sekretion ist, bei unveränderter TNF Sekretion, in p62-defizienten M-MØP stark vermindert	42
Abbildung 15: hTNF induzierte Signalwege in wt und p62 ^{-/-} M-MØPs.....	43
Abbildung 16: Proteinexpression von p62 in p62 Δ ST-M-MØP und Wurfgeschwister Kontrolle M-MØP	44
Abbildung 17: CD40L induzierte Signaltransduktion in wt und p62 Δ STM-MØPs	46
Abbildung 18: mTNF- und mIL-6- Sekretion nach CD40 Stimulation in wt und p62 Δ STM-MØPs ...	47
Abbildung 19: Bildung eines durch CD40 Stimulation- abhängigen p62-TRAF6 Komplex in wt M-MØP	48
Abbildung 20: CD40 Expression in 786-O	49
Abbildung 21: Anreicherung von TRAF2, TRAF6 und p62 am CD40 Rezeptorkomplex in 786-O ...	49
Abbildung 22: p62 Immunpräzipitation nach CD40L bzw. TNF Stimulation.....	50
Abbildung 23: CD40L induzierte Signalwege in 786-O	52
Abbildung 24: Vergleichbare Sekretion von hIL-8 und hIL-6 in p62siRNA- und Kontroll-siRNA transfizierten 786-O nach CD40L Stimulation.....	53
Abbildung 25: Wirkungsmechanismen der p62-abhängigen Modulation von inflammatorischen Signalwegen	60
Abbildung 26: Modell der CD40-abhängigen NF- κ B Aktivierung über p62	63

Literaturverzeichnis:

1. Hayden M, Ghosh S. Shared principles in NF-kappaB signaling. *Cell*. 2008;132(3):344-62. doi: 10.1016/j.cell.2008.01.020.
2. Nathan C. Mechanisms and modulation of macrophage activation. *Behring Inst Mitt*. 1991;88(88):200-7. Epub 1991/02/01. PubMed PMID: 2049039.
3. Mosser DM, Edwards JP. Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat Rev Immunol*. 2008;8(12):958-69.
4. Chen Z, Soo MY, Srinivasan N, Tan BK, Chan SH. Activation of macrophages by polysaccharide-protein complex from *Lycium barbarum* L. *Phytother Res*. 2009;23(8):1116-22.
5. Xie Z, Klionsky DJ. Autophagosome formation: core machinery and adaptations. *Nat Cell Biol*. 2007;9(10):1102-9.
6. Park I, Chung J, Walsh C, Yun Y, Strominger J, Shin J. Phosphotyrosine-independent binding of a 62-kDa protein to the src homology 2 (SH2) domain of p56lck and its regulation by phosphorylation of Ser-59 in the lck unique N-terminal region. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1995;92(26):12338-42.
7. Ishii T, Yanagawa T, Kawane T, Yuki K, Seita J, Yoshida H, et al. Murine peritoneal macrophages induce a novel 60-kDa protein with structural similarity to a tyrosine kinase p56lck-associated protein in response to oxidative stress. *Biochemical and biophysical research communications*. 1996;226(2):456-60. doi: 10.1006/bbrc.1996.1377.
8. Puls A, Schmidt S, Grawe F, Stabel S. Interaction of protein kinase C zeta with ZIP, a novel protein kinase C-binding protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1997;94(12):6191-6.
9. Moscat J, Diaz-Meco M, Albert A, Campuzano S. Cell signaling and function organized by PB1 domain interactions. *Molecular cell*. 2006;23(5):631-40. doi: 10.1016/j.molcel.2006.08.002.
10. Nakamura K, Kimple A, Siderovski D, Johnson G. PB1 domain interaction of p62/sequestosome 1 and MEKK3 regulates NF-kappaB activation. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(3):2077-89. doi: 10.1074/jbc.M109.065102.
11. Sanz L, Sanchez P, Lallena M, Diaz-Meco M, Moscat J. The interaction of p62 with RIP links the atypical PKCs to NF-kappaB activation. *The EMBO journal*. 1999;18(11):3044-53. doi: 10.1093/emboj/18.11.3044.
12. Sanz L, Diaz-Meco M, Nakano H, Moscat J. The atypical PKC-interacting protein p62 channels NF-kappaB activation by the IL-1-TRAF6 pathway. *The EMBO journal*. 2000;19(7):1576-86. doi: 10.1093/emboj/19.7.1576.
13. Pankiv S, Lamark T, Bruun J-A, Øvervatn A, Bjørkøy G, Johansen T. Nucleocytoplasmic shuttling of p62/SQSTM1 and its role in recruitment of nuclear polyubiquitinated proteins to promyelocytic leukemia bodies. *The Journal of biological chemistry*. 2010;285(8):5941-53. doi: 10.1074/jbc.M109.039925.
14. Bjorkoy G, Lamark T, Brech A, Outzen H, Perander M, Overvatn A, et al. p62/SQSTM1 forms protein aggregates degraded by autophagy and has a protective effect on huntingtin-induced cell death. *J Cell Biol*. 2005;171(4):603-14. Epub 2005/11/16. doi: 10.1083/jcb.200507002. PubMed PMID: 16286508; PubMed Central PMCID: PMC2171557.

15. Isogai S, Morimoto D, Arita K, Unzai S, Tenno T, Hasegawa J, et al. Crystal structure of the ubiquitin-associated (UBA) domain of p62 and its interaction with ubiquitin. *J Biol Chem*. 2011;286(36):31864-74.
16. Wang X, Terpstra EJ. Ubiquitin receptors and protein quality control. *J Mol Cell Cardiol*. 2013;55:73-84. Epub 2012/10/11. doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.09.012. PubMed PMID: 23046644; PubMed Central PMCID: PMC3571097.
17. Johansen T, Lamark T. Selective autophagy mediated by autophagic adapter proteins. *Autophagy*. 2011;7(3):279-96. Epub 2010/12/30. doi: 10.4161/auto.7.3.14487. PubMed PMID: 21189453; PubMed Central PMCID: PMC3060413.
18. Sanchez P, De G, Sandoval... I. Localization of atypical protein kinase C isoforms into lysosome-targeted endosomes through interaction with p62. ... and Cellular Biology. 1998.
19. Geetha T, Wooten M. Structure and functional properties of the ubiquitin binding protein p62. *FEBS letters*. 2002;512(1-3):19-24.
20. Kawai K, Saito A, Sudo T, Osada H. Specific regulation of cytokine-dependent p38 MAP kinase activation by p62/SQSTM1. *Journal of biochemistry*. 2008;143(6):765-72. doi: 10.1093/jb/mvn027.
21. Shvets E, Fass E, Scherz-Shouval R, Elazar Z. The N-terminus and Phe52 residue of LC3 recruit p62/SQSTM1 into autophagosomes. *Journal of cell science*. 2008;121(Pt 16):2685-95. doi: 10.1242/jcs.026005.
22. Ichimura Y, Waguri S, Sou Y-S, Kageyama S, Hasegawa J, Ishimura R, et al. Phosphorylation of p62 activates the Keap1-Nrf2 pathway during selective autophagy. *Molecular cell*. 2013;51(5):618-31. doi: 10.1016/j.molcel.2013.08.003.
23. Deretic V. Autophagy as an innate immunity paradigm: expanding the scope and repertoire of pattern recognition receptors. *Current opinion in immunology*. 2012;24(1):21-31. doi: 10.1016/j.coi.2011.10.006.
24. Cemma M, Kim P, Brumell J. The ubiquitin-binding adaptor proteins p62/SQSTM1 and NDP52 are recruited independently to bacteria-associated microdomains to target Salmonella to the autophagy pathway. *Autophagy*. 2011;7(3):341-5. doi: 10.4161/auto.7.3.14046.
25. Zheng Y, Shahnazari S, Brech A, Lamark T, Johansen T, Brumell J. The adaptor protein p62/SQSTM1 targets invading bacteria to the autophagy pathway. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;183(9):5909-16. doi: 10.4049/jimmunol.0900441.
26. Ponpuak M, Davis A, Roberts E, Delgado M, Dinkins C, Zhao Z, et al. Delivery of cytosolic components by autophagic adaptor protein p62 endows autophagosomes with unique antimicrobial properties. *Immunity*. 2010;32(3):329-41. doi: 10.1016/j.immuni.2010.02.009.
27. Luo RZ, Yuan ZY, Li M, Xi SY, Fu J, He J. Accumulation of p62 is associated with poor prognosis in patients with triple-negative breast cancer. *Onco Targets Ther*. 2013;6:883-8. Epub 2013/07/28. doi: 10.2147/OTT.S46222. PubMed PMID: 23888115; PubMed Central PMCID: PMC3722135.
28. Inoue D, Suzuki T, Mitsuishi Y, Miki Y, Suzuki S, Sugawara S, et al. Accumulation of p62/SQSTM1 is associated with poor prognosis in patients with lung adenocarcinoma. *Cancer Sci*. 2012;103(4):760-6. Epub 2012/02/11. doi: 10.1111/j.1349-7006.2012.02216.x. PubMed PMID: 22320446.

29. Kitamura H, Torigoe T, Asanuma H, Hisasue SI, Suzuki K, Tsukamoto T, et al. Cytosolic overexpression of p62 sequestosome 1 in neoplastic prostate tissue. *Histopathology*. 2006;48(2):157-61. Epub 2006/01/13. doi: 10.1111/j.1365-2559.2005.02313.x. PubMed PMID: 16405664.
30. Deborah LG, Roodman GD. Pathobiology of Paget's Disease of Bone. *Journal of Bone Metabolism*. 2014;21(2). doi: 10.11005/jbm.2014.21.2.85.
31. Daroszewska A, van 't Hof RJ, Rojas JA, Layfield R, Landao-Basonga E, Rose L, et al. A point mutation in the ubiquitin-associated domain of SQSMT1 is sufficient to cause a Paget's disease-like disorder in mice. *Hum Mol Genet*. 2011;20(14):2734-44. Epub 2011/04/26. doi: 10.1093/hmg/ddr172. PubMed PMID: 21515589.
32. Rodriguez A, Durán A, Selloum M, Champy M-F, Diez-Guerra F, Flores J, et al. Mature-onset obesity and insulin resistance in mice deficient in the signaling adapter p62. *Cell metabolism*. 2006;3(3):211-22. doi: 10.1016/j.cmet.2006.01.011.
33. Carswell E, Old L, Kassel R, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1975;72(9):3666-70.
34. Bodmer J-L, Schneider P, Tschopp J. The molecular architecture of the TNF superfamily. *Trends in Biochemical Sciences*. 2002;27(1):19-26. doi: 10.1016/s0968-0004(01)01995-8.
35. Hehlhans T, Pfeffer K. The intriguing biology of the tumour necrosis factor/tumour necrosis factor receptor superfamily: players, rules and the games. *Immunology*. 2005;115(1):1-20. doi: 10.1111/j.1365-2567.2005.02143.x.
36. Sofia F, Maria K, Bernhard S. Therapeutic implications of osteoprotegerin. *Cancer Cell International*. 2009;9(1):26. doi: 10.1186/1475-2867-9-26.
37. Liu W, Zhan C, Cheng H, Kumar PR, Bonanno JB, Nathenson SG, et al. Mechanistic basis for functional promiscuity in the TNF and TNF receptor superfamilies: structure of the LIGHT:DcR3 assembly. *Structure*. 2014;22(9):1252-62. Epub 2014/08/05. doi: 10.1016/j.str.2014.06.013. PubMed PMID: 25087510; PubMed Central PMCID: PMC4163024.
38. Aderka D. The potential biological and clinical significance of the soluble tumor necrosis factor receptors. *Cytokine & growth factor reviews*. 1996;7(3):231-40.
39. Smith C, Farrah T, Goodwin R. The TNF receptor superfamily of cellular and viral proteins: activation, costimulation, and death. *Cell*. 1994;76(6):959-62.
40. Aggarwal BB. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(9):745-56.
41. Ashkenazi A. Death Receptors: Signaling and Modulation. *Science*. 1998;281. doi: 10.1126/science.281.5381.1305.
42. Gray P, Aggarwal B, Benton C, Bringman T, Henzel W, Jarrett J, et al. Cloning and expression of cDNA for human lymphotoxin, a lymphokine with tumour necrosis activity. *Nature*. 1984;312(5996):721-4.
43. Havell EA. Evidence that tumor necrosis factor has an important role in antibacterial resistance. *J Immunol*. 1989;143(9):2894-9.
44. Grell M, Douni E, Wajant H, Lohden M, Clauss M, Maxeiner B, et al. The transmembrane form of tumor necrosis factor is the prime activating ligand of the 80 kDa tumor necrosis factor receptor. *Cell*. 1995;83(5):793-802.

45. Naude PJ, den Boer JA, Luiten PG, Eisel UL. Tumor necrosis factor receptor cross-talk. *FEBS J.* 2011;278(6):888-98. Epub 2011/01/15. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08017.x. PubMed PMID: 21232019.
46. Kato K, Nakane A, Minagawa T, Kasai N, Yamamoto K, Sato N, et al. Human tumor necrosis factor increases the resistance against *Listeria* infection in mice. *Med Microbiol Immunol.* 1989;178(6):337-46. Epub 1989/01/01. PubMed PMID: 2559307.
47. Pfeffer K, Matsuyama T, Kundig TM, Wakeham A, Kishihara K, Shahinian A, et al. Mice deficient for the 55 kd tumor necrosis factor receptor are resistant to endotoxic shock, yet succumb to *L. monocytogenes* infection. *Cell.* 1993;73(3):457-67.
48. Schneider-Brachert W, Tchikov V, Neumeyer J, Jakob M, Winoto-Morbach S, Held-Feindt J, et al. Compartmentalization of TNF receptor 1 signaling: internalized TNF receptosomes as death signaling vesicles. *Immunity.* 2004;21(3):415-28.
49. Nikolettou V, Markaki M, Palikaras K, Tavernarakis N. Crosstalk between apoptosis, necrosis and autophagy. *Biochim Biophys Acta.* 2013;1833(12):3448-59. Epub 2013/06/19. doi: 10.1016/j.bbamcr.2013.06.001. PubMed PMID: 23770045.
50. Noelle RJ, Ledbetter JA, Aruffo A. CD40 and its ligand, an essential ligand-receptor pair for thymus-dependent B-cell activation. *Immunol Today.* 1992;13(11):431-3.
51. van Kooten C, Banchereau J. CD40-CD40 ligand. *Journal of leukocyte biology.* 2000;67(1):2-17.
52. Stout RD, Suttles J, Xu J, Grewal IS, Flavell RA. Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice. *J Immunol.* 1996;156(1):8-11.
53. Andrade RM, Wessendarp M, Portillo JA, Yang JQ, Gomez FJ, Durbin JE, et al. TNF receptor-associated factor 6-dependent CD40 signaling primes macrophages to acquire antimicrobial activity in response to TNF- α . *J Immunol.* 2005;175(9):6014-21.
54. Wyzgol A, Muller N, Fick A, Munkel S, Grigoleit GU, Pfizenmaier K, et al. Trimer stabilization, oligomerization, and antibody-mediated cell surface immobilization improve the activity of soluble trimers of CD27L, CD40L, 41BBL, and glucocorticoid-induced TNF receptor ligand. *J Immunol.* 2009;183(3):1851-61. Epub 2009/07/15. doi: 10.4049/jimmunol.0802597. PubMed PMID: 19596991.
55. Bishop G, Moore C, Xie P, Stunz L, Kraus Z. TRAF proteins in CD40 signaling. *Advances in experimental medicine and biology.* 2007;597:131-51. doi: 10.1007/978-0-387-70630-6_11.
56. Ye H, Arron JR, Lamothe B, Cirilli M, Kobayashi T, Shevde NK, et al. Distinct molecular mechanism for initiating TRAF6 signalling. *Nature.* 2002;418(6896):443-7.
57. Elgueta R, Benson MJ, de Vries VC, Wasiuk A, Guo Y, Noelle RJ. Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system. *Immunol Rev.* 2009;229(1):152-72. Epub 2009/05/12. doi: 10.1111/j.1600-065X.2009.00782.x. PubMed PMID: 19426221; PubMed Central PMCID: PMC3826168.
58. Xie P. TRAF molecules in cell signaling and in human diseases. *J Mol Signal.* 2013;8(1):7. Epub 2013/06/14. doi: 10.1186/1750-2187-8-7. PubMed PMID: 23758787; PubMed Central PMCID: PMC3697994.
59. Li Q, Verma IM. NF- κ B regulation in the immune system. *Nat Rev Immunol.* 2002;2(10):725-34.

60. Wajant H, Scheurich P. TNFR1-induced activation of the classical NF-kappaB pathway. *FEBS J.* 2011;278(6):862-76. Epub 2011/01/15. doi: 10.1111/j.1742-4658.2011.08015.x. PubMed PMID: 21232017.
61. Xaus J, Comalada M, Valledor AF, Lloberas J, Lopez-Soriano F, Argiles JM, et al. LPS induces apoptosis in macrophages mostly through the autocrine production of TNF-alpha. *Blood.* 2000;95(12):3823-31.
62. Wertz IE, O'Rourke KM, Zhou H, Eby M, Aravind L, Seshagiri S, et al. De-ubiquitination and ubiquitin ligase domains of A20 downregulate NF-kappaB signalling. *Nature.* 2004;430(7000):694-9.
63. Coope HJ, Atkinson PG, Huhse B, Belich M, Janzen J, Holman MJ, et al. CD40 regulates the processing of NF-kappaB2 p100 to p52. *EMBO J.* 2002;21(20):5375-85. Epub 2002/10/11. doi: 10.1093/emboj/cdf542. PubMed PMID: 12374738; PubMed Central PMCID: PMC129074.
64. Sun S-C. Non-canonical NF-kB signaling pathway. *Cell research.* 2011;21(1):71-85. doi: 10.1038/cr.2010.177.
65. Pearson G, Robinson F, Beers Gibson T, Xu B, Karandikar M, Berman K, et al. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine reviews.* 2001;22(2):153-83. doi: 10.1210/edrv.22.2.0428.
66. Raman M, Chen W, Cobb MH. Differential regulation and properties of MAPKs. *Oncogene.* 2007;26(22):3100-12. Epub 2007/05/15. doi: 10.1038/sj.onc.1210392. PubMed PMID: 17496909.
67. Wada T, Penninger JM. Mitogen-activated protein kinases in apoptosis regulation. *Oncogene.* 2004;23(16):2838-49.
68. Kim G-Y, Nigro P, Fujiwara K, Abe J-i, Berk B. p62 binding to protein kinase C ζ regulates tumor necrosis factor α -induced apoptotic pathway in endothelial cells. *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology.* 2012;32(12):2974-80. doi: 10.1161/atvbaha.112.300054.
69. Franke TF. PI3K/Akt: getting it right matters. *Oncogene.* 2008;27(50):6473-88. Epub 2008/10/29. doi: 10.1038/onc.2008.313. PubMed PMID: 18955974.
70. Manning BD, Cantley LC. AKT/PKB signaling: navigating downstream. *Cell.* 2007;129(7):1261-74. Epub 2007/07/03. doi: 10.1016/j.cell.2007.06.009. PubMed PMID: 17604717; PubMed Central PMCID: PMC2756685.
71. Kim AH, Khursigara G, Sun X, Franke TF, Chao MV. Akt phosphorylates and negatively regulates apoptosis signal-regulating kinase 1. *Mol Cell Biol.* 2001;21(3):893-901.
72. Elmetwali T, Young LS, Palmer DH. CD40 ligand-induced carcinoma cell death: a balance between activation of TNFR-associated factor (TRAF) 3-dependent death signals and suppression of TRAF6-dependent survival signals. *J Immunol.* 2010;184(2):1111-20. Epub 2009/12/17. doi: 10.4049/jimmunol.0900528. PubMed PMID: 20008286.
73. Hauer J, Puschner S, Ramakrishnan P, Simon U, Bongers M, Federle C, et al. TNF receptor (TNFR)-associated factor (TRAF) 3 serves as an inhibitor of TRAF2/5-mediated activation of the noncanonical NF-kappaB pathway by TRAF-binding TNFRs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;102(8):2874-9.

74. Brown K, Hostager B, Bishop G. Regulation of TRAF2 signaling by self-induced degradation. *The Journal of biological chemistry*. 2002;277(22):19433-8. doi: 10.1074/jbc.M111522200.
75. O'Neill LA, Golenbock D, Bowie AG. The history of Toll-like receptors - redefining innate immunity. *Nat Rev Immunol*. 2013;13(6):453-60. Epub 2013/05/18. doi: 10.1038/nri3446. PubMed PMID: 23681101.
76. Ferrao R, Li J, Bergamin E, Wu H. Structural insights into the assembly of large oligomeric signalosomes in the Toll-like receptor-interleukin-1 receptor superfamily. *Science signaling*. 2012;5(226). doi: 10.1126/scisignal.2003124.
77. Into T, Inomata M, Niida S, Murakami Y, Shibata K-i. Regulation of MyD88 Aggregation and the MyD88-dependent Signaling Pathway by Sequestosome 1 and Histone Deacetylase 6. *Journal of Biological Chemistry*. 2010;285. doi: 10.1074/jbc.M110.126904.
78. Durán A, Serrano M, Leitges M, Flores J, Picard... S. The atypical PKC-interacting protein p62 is an important mediator of RANK-activated osteoclastogenesis. *Developmental cell*. 2004.
79. Chamoux E, McManus S, Laberge G, Bisson M, Roux S. Involvement of kinase PKC-zeta in the p62/p62(P392L)-driven activation of NF-kappaB in human osteoclasts. *Biochim Biophys Acta*. 2013;1832(3):475-84. Epub 2012/12/26. doi: 10.1016/j.bbadis.2012.12.008. PubMed PMID: 23266528.
80. Pullen SS, Labadia ME, Ingraham RH, McWhirter SM, Everdeen DS, Alber T, et al. High-affinity interactions of tumor necrosis factor receptor-associated factors (TRAFs) and CD40 require TRAF trimerization and CD40 multimerization. *Biochemistry*. 1999;38(31):10168-77.
81. Portillo J-AC, Schwartz I, Zarini S, Bapputty R, Kern T, Gubitosi-Klug R, et al. Proinflammatory Responses Induced by CD40 in Retinal Endothelial and Müller Cells are Inhibited by Blocking CD40-Traf2,3 or CD40-Traf6 Signaling. *Investigative ophthalmology & visual science*. 2014;55(12):8590-7. doi: 10.1167/iovs.14-15340.
82. Jabara H, Laouini D, Tsitsikov E, Mizoguchi E, Bhan A, Castigli E, et al. The binding site for TRAF2 and TRAF3 but not for TRAF6 is essential for CD40-mediated immunoglobulin class switching. *Immunity*. 2002;17(3):265-76.
83. Davies C, Mak T, Young L, Eliopoulos A. TRAF6 is required for TRAF2-dependent CD40 signal transduction in nonhemopoietic cells. *Molecular and cellular biology*. 2005;25(22):9806-19. doi: 10.1128/mcb.25.22.9806-9819.2005.
84. Rowland S, Tremblay M, Ellison J, Stunz L, Bishop G, Hostager B. A novel mechanism for TNFR-associated factor 6-dependent CD40 signaling. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2007;179(7):4645-53. doi: 10.4049/jimmunol.179.7.4645.
85. Bürgis S. Interleukin-4-Receptor Signal Transduction: Involvement of P62
Interleukin-4-Rezeptor Signaltransduktion: Beteiligung des P62 Proteins 2006.
86. Flanagan AM, Lader CS. Update on the biologic effects of macrophage colony-stimulating factor. *Curr Opin Hematol*. 1998;5(3):181-5.
87. Singh R, Jamieson A, Cresswell P. GILT is a critical host factor for *Listeria monocytogenes* infection. *Nature*. 2008;455(7217):1244-7. doi: 10.1038/nature07344.
88. Wang GG, Calvo KR, Pasillas MP, Sykes DB, Hacker H, Kamps MP. Quantitative production of macrophages or neutrophils ex vivo using conditional Hoxb8. *Nat Methods*. 2006;3(4):287-93. Epub 2006/03/24. doi: 10.1038/nmeth865. PubMed PMID: 16554834.

89. Mostowy S, Sancho-Shimizu V, Hamon M, Simeone R, Brosch R, Johansen T, et al. p62 and NDP52 proteins target intracytosolic Shigella and Listeria to different autophagy pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2011;286(30):26987-95. doi: 10.1074/jbc.M111.223610.
90. Tripp CS, Wolf SF, Unanue ER. Interleukin 12 and tumor necrosis factor alpha are costimulators of interferon gamma production by natural killer cells in severe combined immunodeficiency mice with listeriosis, and interleukin 10 is a physiologic antagonist. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993;90(8):3725-9.
91. Miller YI, Choi SH, Wiesner P, Bae YS. The SYK side of TLR4: signalling mechanisms in response to LPS and minimally oxidized LDL. *Br J Pharmacol*. 2012;167(5):990-9.
92. Lewis M, Tartaglia LA, Lee A, Bennett GL, Rice GC, Wong GH, et al. Cloning and expression of cDNAs for two distinct murine tumor necrosis factor receptors demonstrate one receptor is species specific. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88(7):2830-4.
93. Schmid M, Wege AK, Ritter U. Characteristics of "Tip-DCs and MDSCs" and Their Potential Role in Leishmaniasis. *Front Microbiol*. 2012;3(74).
94. Salzmann S, Lang I, Rosenthal A, Schafer V, Weisenberger D, Carmona Arana JA, et al. TWEAK inhibits TRAF2-mediated CD40 signaling by destabilization of CD40 signaling complexes. *J Immunol*. 2013;191(5):2308-18. Epub 2013/08/07. doi: 10.4049/jimmunol.1202899. PubMed PMID: 23918987.
95. Ivashkiv LB. Epigenetic regulation of macrophage polarization and function. *Trends in Immunology*. 2013;34(5):216-23. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.it.2012.11.001>.
96. Suttles J, Stout RD. Macrophage CD40 signaling: a pivotal regulator of disease protection and pathogenesis. *Semin Immunol*. 2009;21(5):257-64. Epub 2009/06/23. doi: 10.1016/j.smim.2009.05.011. PubMed PMID: 19540774.
97. Park EK, Jung HS, Yang HI, Yoo MC, Kim C, Kim KS. Optimized THP-1 differentiation is required for the detection of responses to weak stimuli. *Inflamm Res*. 2007;56(1):45-50. Epub 2007/03/06. doi: 10.1007/s00011-007-6115-5. PubMed PMID: 17334670.
98. Rosas M, Osorio F, Robinson MJ, Davies LC, Dierkes N, Jones SA, et al. Hoxb8 conditionally immortalised macrophage lines model inflammatory monocytic cells with important similarity to dendritic cells. *Eur J Immunol*. 2011;41(2):356-65.
99. Simon M, Greenaway S, White J, Fuchs... H. A comparative phenotypic and genomic analysis of C57BL/6J and C57BL/6N mouse strains. *Genome* 2013. doi: 10.1186/gb-2013-14-7-r82.
100. Zhang S, Kim CC, Batra S, McKerrow JH, Loke P. Delineation of diverse macrophage activation programs in response to intracellular parasites and cytokines. *PLoS Negl Trop Dis*. 2010;4(3):0000648.
101. Yoshikawa Y, Ogawa M, Hain T, Chakraborty T, Sasakawa C. *Listeria monocytogenes* ActA is a key player in evading autophagic recognition. *Autophagy*. 2009;5(8):1220-1.
102. Heigl U. Impact of tumor necrosis factor receptor-1 signalling to *Listeria monocytogenes*-containing phagosomes and its role for bacterial eradication 2013.
103. Leitges M, Sanz L, Martin P, Duran A, Braun U, Garcia JF, et al. Targeted disruption of the zetaPKC gene results in the impairment of the NF-kappaB pathway. *Mol Cell*. 2001;8(4):771-80.

- 104.Ohtsuka S, Ishii Y, Matsuyama M, Ano S, Morishima Y, Yanagawa T, et al. SQSTM1/p62/A170 regulates the severity of *Legionella pneumophila* pneumonia by modulating inflammasome activity. *Eur J Immunol*. 2014;44(4):1084-92. Epub 2014/01/01. doi: 10.1002/eji.201344091. PubMed PMID: 24374573.
- 105.Lee H-M, Shin D-M, Yuk J-M, Shi G, Choi D-K, Lee S-H, et al. Autophagy negatively regulates keratinocyte inflammatory responses via scaffolding protein p62/SQSTM1. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2011;186(2):1248-58. doi: 10.4049/jimmunol.1001954.
- 106.Choy A, Dancourt J, Mugo B, O'Connor TJ, Isberg RR, Melia TJ, et al. The *Legionella* effector RavZ inhibits host autophagy through irreversible Atg8 deconjugation. *Science*. 2012;338(6110):1072-6.
- 107.Choe JY, Jung HY, Park KY, Kim SK. Enhanced p62 expression through impaired proteasomal degradation is involved in caspase-1 activation in monosodium urate crystal-induced interleukin-1 β expression. *Rheumatology*. 2014;53(6):1043-53.
- 108.Kim J, Ozato K. The sequestosome 1/p62 attenuates cytokine gene expression in activated macrophages by inhibiting IFN regulatory factor 8 and TNF receptor-associated factor 6/NF- κ B activity. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 2009;182(4):2131-40. doi: 10.4049/jimmunol.0802755.
- 109.Lee J, Kim H, Quinley C, Kim J, Gonzalez-Navajas J, Xavier R, et al. Autophagy suppresses interleukin-1 β (IL-1 β) signaling by activation of p62 degradation via lysosomal and proteasomal pathways. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(6):4033-40. doi: 10.1074/jbc.M111.280065.
- 110.Linares JF, Duran A, Yajima T, Pasparakis M, Moscat J, Diaz-Meco MT. K63 polyubiquitination and activation of mTOR by the p62-TRAF6 complex in nutrient-activated cells. *Mol Cell*. 2013;51(3):283-96.
- 111.Mukundan L, Bishop G, Head... K. TNF receptor-associated factor 6 is an essential mediator of CD40-activated proinflammatory pathways in monocytes and macrophages. *The Journal of ...*. 2005. doi: 10.4049/jimmunol.174.2.1081.
- 112.Pullen SS, Miller HG, Everdeen DS, Dang TT, Crute JJ, Kehry MR. CD40-tumor necrosis factor receptor-associated factor (TRAF) interactions: regulation of CD40 signaling through multiple TRAF binding sites and TRAF hetero-oligomerization. *Biochemistry*. 1998;37(34):11836-45.
- 113.Manning E, Pullen SS, Souza DJ, Kehry M, Noelle RJ. Cellular responses to murine CD40 in a mouse B cell line may be TRAF dependent or independent. *European journal of immunology*. 2002;32(1):39-49. doi: 10.1002/1521-4141(200201)32:1<39::aid-immu39>3.0.co;2-y.
- 114.Hostager BS. Roles of TRAF6 in CD40 signaling. *Immunologic Research*. 2007;39(1-3):105-14. doi: 10.1007/s12026-007-0082-3.
- 115.Hostager BS, Catlett IM, Bishop GA. Recruitment of CD40 and tumor necrosis factor receptor-associated factors 2 and 3 to membrane microdomains during CD40 signaling. *J Biol Chem*. 2000;275(20):15392-8.
- 116.Chatzigeorgiou A, Seijkens T, Zarzycka B, Engel D, Poggi M, van den Berg S, et al. Blocking CD40-TRAF6 signaling is a therapeutic target in obesity-associated insulin resistance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014;111(7):2686-91.

Danksagung

Prof. Dr. Dr. André Gessner und Dr. Dr. Martin Ehrenschwender danke ich für die sehr gute wissenschaftliche Betreuung meiner Arbeit.

Prof. Dr. Gernot Längst und Prof. Dr. Stefan Schütze danke ich für die Bereitschaft, die Arbeit als Gutachter engagiert zu begleiten.

Ich danke den lieben Menschen Elke Perthen, Maria Kurz und Sebastian Bittner für ihre Art und den Humor, der das Arbeitsklima einzigartig gemacht hat. Im Besonderen danke ich Ulrike Heigl, die mir immer mit einem offenen Ohr zur Seite stand und mit der ich eine Freundin hinzugewonnen habe. Gertrud Knoll danke ich für viele nützliche Ratschläge und für das geduldige Ertragen meines Ordnungswahns. Weiterhin möchte mich auch bei den anderen, auch ehemaligen Mitgliedern des Instituts dafür bedanken, dass ich mit offenen Armen empfangen wurde und mir das Eingewöhnen in Regensburg so leicht gemacht wurde. Es bleiben die Erinnerungen an so manch schöne Abende.

Ich möchte mich auch bei Verena Stoffel, Verena De Maria Campos und Andreas Rüdinger für die langjährige Freundschaft und Solidarität bedanken. W. von B. und T.T. danke ich für die moralische Unterstützung während des Schreibprozesses.

Nicht zuletzt bedanke ich mich bei meiner Familie und Benjamin Zimmer für die Unterstützung und Liebe, die mir diesen Lebensweg ermöglicht und mich zu dem Menschen gemacht haben, der ich heute bin.